

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELAINE KASPCHAK

CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA E CAPACIDADE GELEIFICANTE DE
UM ISOLADO PROTEICO DE GRÃOS DE QUINOA (*Chenopodium quinoa*)

CURITIBA

2015

ELAINE KASPBCHAK

CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA E CAPACIDADE GELEIFICANTE DE
UM ISOLADO PROTEICO DE GRÃOS DE QUINOA (*Chenopodium quinoa*)

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Engenharia
de Alimentos, no Curso de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr. Luciana Igarashi Mafra.

CURITIBA

2015

K19c

Kaspchak, Elaine

Caracterização térmica e capacidade geleificante de um isolado proteico de grãos de quinoa (*Chenopodium quinoa*)/ Elaine Kaspchak. – Curitiba, 2015.

110 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2015.

Orientador: Luciana Igarashi Mafra .

Bibliografia: p. 88-101.

1. Proteínas - Desnaturação. 2. Análise térmica. 3. Reologia -Medição. 4. Solubilidade. 5. Eletroforese em gel. I. Universidade Federal do Paraná. II.Mafra, Luciana Igarashi. III. Título.


CDD: 664.25

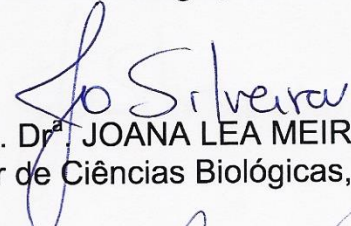
ELAINE KASPCHAK

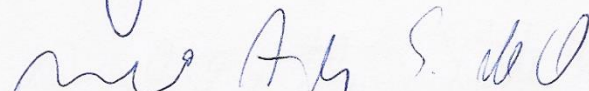
**CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA E CAPACIDADE GELEIFICANTE
DE UM ISOLADO PROTEICO DE GRÃOS DE QUINOA
(*Chenopodium quinoa*)**


Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientadora:


Prof.^a Dr.^a LUCIANA IGARASHI MAFRA
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof.^a Dr.^a JOANA LEA MEIRA SILVEIRA
Setor de Ciências Biológicas, UFPR


Prof. Dr. MARCO AURÉLIO SCHÜLER DE OLIVEIRA
Setor de Ciências Biológicas, UFPR


Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO MAFRA
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 03 de fevereiro de 2015.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Paulo e Inês, pelo amor
incondicional e apoio em todas as
etapas da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter proporcionado capacidade para o desenvolvimento desse trabalho.

A minha família, em especial aos meus irmãos, Elcio, Edilson e Emiliana, que sempre me apoiaram e torceram por mim.

Aos meus orientadores Dr.^a Luciana Igarashi-Mafra e Dr. Marcos Rogério Mafra pela orientação e conhecimentos transmitidos.

Às técnicas de laboratório Andrea, Patrícia e Sheila pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

A Dr.^a Fernanda Simas e Profa. Dr.^a Joana Léa Meira Silveira por possibilitar a realização das análises reológicas, pelos conselhos e tempo dedicados.

Ao Dr. Marco Aurélio pela disposição em sempre ajudar, pelo auxílio nas etapas de extração de proteína, nas análises de eletroforese e MALDI-ToF/MS.

Ao Felipe, por fazer parte da minha vida, pelo seu amor e companheirismo.

Aos amigos do LATOS Danielle Carpiné, João, Giovanna, Thiago, Lizandra, Caroline, Cíntia, Camila, Lilian e Daniela Sampaio pela ajuda sempre em tudo que precisei, pelos conselhos e pela amizade.

Aos amigos do PPGEAL Ronald, Thaisa, Amanda, Ana Paula, Fabiane, Gerson, Anderson, Heron, Erika e Eriel pela amizade.

Às minhas orientadoras de iniciação científica Lyssa Setsuko Sakanaka e Leda Battestin Quast por acreditarem em meu potencial.

A EMBRAPA Cerrados de Brasília pelo fornecimento dos grãos de quinoa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFPR pela oportunidade e a CAPES por conceder a bolsa de mestrado.

A todos que de alguma maneira colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A quinoa é um pseudocereal originário dos Andes, cultivado e consumido há milhares de anos que vem se popularizando em todo o mundo devido ao seu alto valor nutricional. As proteínas da quinoa apresentam grande quantidade de aminoácidos essenciais fundamentais para a vida humana e são compostas principalmente por globulina 11S e albumina 2S. O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar um isolado proteico de quinoa (IPQ) da variedade BRS Piabiru, e avaliar a sua estabilidade térmica e capacidade geleificante. A composição físico-química do IPQ foi determinada e as proteínas identificadas por meio de eletroforese associada à espectrometria de massas MALDI-ToF. A estabilidade térmica do IPQ foi analisada mediante calorimetria exploratória diferencial (DSC) para concentrações de IPQ de 10% e 15%, nos pHs 3,5 e 7,0 com adição dos sais CaCl_2 e MgCl_2 . A capacidade geleificante foi estudada nas mesmas condições da análise de DSC mediante reologia oscilatória com a obtenção dos valores de G' e G'' durante rampa de aquecimento e resfriamento e a temperatura de geleificação foi encontrada pelo ajuste dos dados a equação sigmoidal de Boltzmann. O IPQ obtido neste trabalho apresentou composição elevada de proteínas (88,53%). As proteínas de quinoa mostraram estabilidade térmica elevada, com temperatura de desnaturação próxima a 80°C, sendo que a adição dos íons divalentes proporcionaram temperaturas de desnaturação mais elevadas. Foi observado que as proteínas de quinoa exibem capacidade geleificante tanto no pH 3,5 quanto no pH 7,0, porém no pH 7,0 estes géis não são estáveis ao resfriamento. Os géis formados em pH 3,5 foram mais fortes do que os obtidos em pH 7,0 ao final dos experimentos de reologia (aquecimento e resfriamento). Os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} auxiliaram a formação de géis proteicos no pH 3,5 formando soluções de alta viscoelasticidade no início dos experimentos as quais foram menos influenciadas por variações de temperatura. Quando o íon Ca^{2+} foi adicionado às amostras em pH 3,5 foram formados géis a frio. No pH 7,0 os íons adicionados não auxiliaram na formação de géis proteicos de quinoa. A desnaturação foi essencial no aumento da viscoelasticidade do IPQ durante análise reológica das soluções proteicas em pH 7,0. No pH 3,5 as soluções proteicas apresentaram um aumento da força do gel antes da temperatura de desnaturação, mostrando que não é necessária uma desnaturação completa para a formação de géis neste pH.

Palavras chave: *desnaturação, análises térmicas, reologia oscilatória, íons divalentes, solubilidade, gel.*

ABSTRACT

Quinoa is a pseudocereal native from the Andean regions, grown and consumed for thousands of years and has become more popular around the world because of its high nutritional value. The quinoa proteins show a high amount of essential amino acids fundamental for human life and are composed mainly of 11S globulin and 2S albumin. The aim of this work was to obtain and characterize a quinoa protein isolated (QPI) of the variety BRS Piabiru, and evaluate its thermal stability and gelation capacity. The physical and chemical composition of the QPI was determined and the proteins identified by electrophoresis associated with MALDI-ToF mass spectrometry. The thermal stability of IPQ was analyzed by differential scanning calorimetry (DSC) with IPQ concentrations of 10% and 15% at pH 3.5 and 7.0 with addition of CaCl_2 and MgCl_2 . The gelation ability was studied under the same conditions of DSC by dynamic oscillatory measurements to obtain the G' and G'' for heating and cooling ramp and gelling temperatures were obtained by fitting the data to sigmoidal Boltzmann equation. The IPQ obtained in this study showed high composition of proteins (88.53%). The quinoa proteins demonstrate high thermal stability, with a denaturation temperature of around 80°C. The addition of divalent ions promoted higher denaturation temperatures. It was observed that the quinoa proteins exhibit gelation capacity both in pH 3.5 and pH 7.0, but in pH 7.0 gels are not stable to cooling. The gels formed at pH 3.5 were stronger than those obtained at pH 7.0 after rheology experiments (heating and cooling). The Ca^{2+} and Mg^{2+} helped protein gelation in pH 3.5 forming high viscoelasticity solutions at the beginning of the experiments which were less influenced by temperature variations. When the Ca^{2+} was added to the samples at pH 3.5 were formed cold-set gels. At pH 7.0 the ions added did not help in the formation of quinoa protein gels. Denaturation was essential in the increase of IPQ viscoelasticity for protein solutions at pH 7.0. In pH 3.5 the protein solution showed an increase in gel strength before the denaturation temperature, showing that it is not necessary a complete denaturing for the gel formation at this pH.

Keywords: *denaturation, thermal analysis, rheology, divalent ions, solubility, gel.*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CORTE LONGITUDINAL DO GRÃO DE QUINOA.....	20
FIGURA 2.2 – ESQUEMA DA GELEIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS GLOBULARES A QUENTE DURANTE ETAPAS DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO.....	28
FIGURA 2.3 – ELEMENTOS ESTRUTURAIS FORMADOS DURANTE A GELEIFICAÇÃO DE DIFERENTES PROTEÍNAS	30
FIGURA 2.4 – DIFERENTES ESTRUTURAS DE GEL FORMADAS EM PH 4,6 E 6,8, COM E SEM AGITAÇÃO.....	33
FIGURA 2.5 – SISTEMA CONE-PLACA COM CONE TRUNCADO.	37
FIGURA 2.6 – ESPECTRO MECANICO TÍPICO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS.	39
FIGURA 3.1 – FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DO ISOLADO PROTEICO DE QUINOA.....	47
FIGURA 4.1 – ELETOFORESE EM GEL DESNATURANTE TRIS-TRICINA- SDS REALIZADA PARA AS PROTEINAS EXTRAÍDAS DA QUINOA.....	57
FIGURA 4.2 – TESTE DO AMIDO PARA OS DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA DE QUINOA.....	58
FIGURA 4.3 – AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE NaCl EM FUNÇÃO DO TEMPO DE DIÁLISE POR MEIO DA SUA CONDUTIVIDADE .	60
FIGURA 4.4 – ELETROFORESE DO ISOLADO PROTEICO DE QUINOA EM GEL DE TRIS-GLICINA-SDS.....	62
FIGURA 4.5 – CURVA DE TG E DTG PARA O ISOLADO PROTEICO DE QUINOA LIOFILIZADO.	66
FIGURA 4.6 – SOLUBILIDADE DO ISOLADO PROTEICO DE QUINOA EM FUNÇÃO DO PH EM FORÇA IÔNICA DE 0,3.....	69

FIGURA 4.7 - VARIAÇÃO DO G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO, PARAS SOLUÇÕES DE IPQ EM PH 3,5.....	73
FIGURA 4.8 - VARIAÇÃO DO G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO, PARAS SOLUÇÕES DE IPQ NO PH 3,5 COM ADIÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO.....	74
FIGURA 4.9 - VARIAÇÃO DO G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO, PARAS SOLUÇÕES DE IPQ NO PH 3,5 COM ADIÇÃO DE CLORETO DE MAGNÉSIO.....	76
FIGURA 4.10 - VARIAÇÃO DO G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO, PARAS SOLUÇÕES DE IPQ NO PH 7,0.....	79
FIGURA 4.11 - VARIAÇÃO DO G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO, PARAS SOLUÇÕES DE IPQ NO PH 7 COM ADIÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO.....	80
FIGURA 4.12 - VARIAÇÃO DO G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO, PARAS SOLUÇÕES DE IPQ NO PH 7 COM ADIÇÃO DE CLORETO DE MAGNÉSIO.....	81
FIGURA 4.13 – GRAU DE DESNATURAÇÃO PROTEICA PARA AS DIFERENTES SOLUÇÕES PROTEICAS ANALISADAS POR DSC.	84

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE GRÃOS DE QUINOA DE DOS PAÍSES BOLÍVIA, BRASIL, CANADÁ E CHILE	21
TABELA 2.2 – EXPORTAÇÕES DE GRÃOS DE QUINOA DA BOLÍVIA E PERU	24
TABELA 2.3 - PERFIL DE AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS PRESENTE NA QUINOA E EM PROTEÍNAS DE OUTRAS FONTES	25
TABELA 2.4 – CLASSIFICAÇÃO DOS FATORES QUE INFLUENCIAM NA FORMAÇÃO DE GÉIS PROTEICOS.....	31
TABELA 2.5 – ESTUDO DA GELEIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SOJA, LEITE E AMARANTO UTILIZANDO DIFERENTES TÉCNICAS	36
TABELA 2.6 - PRINCIPAIS INTERAÇÕES RESPONSÁVEIS PELOS NÍVEIS DE ESTRUTURAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	41
TABELA 3.1 – PARÂMETROS UTILIZADOS PARA ISOLAMENTO DE PROTEÍNAS DE QUINOA	46
TABELA 3.2 – CONDIÇÕES DE PH, % DE ISOLADO PROTEICO DE QUINOA E ADIÇÃO DE SAL TESTADAS UTILIZADAS PARA AS ANÁLISES DE DSC E DE REOLOGIA OSCILATÓRIA.....	54
TABELA 4.1 – RENDIMENTO DE PROTEÍNA EXTRAÍDA DA FARINHA DE QUINOA.....	56
TABELA 4.2 – ESTIMATIVA DA MASSA MOLAR DAS PROTEÍNAS ANALISADAS POR ELETROFORESE EM CONDIÇÕES REDUTORAS E NÃO REDUTORAS	62
TABELA 4.3 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE ESPETROMETRIA DE MASSA OBTIDO POR MEIO DO PROGRAMA MASCOT DAS BANDAS RECORTADAS DO GEL DE ELETROFORESE DO IPQ.....	64

TABELA 4.4 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO ISOLADO PROTEICO DE QUINOA.....	68
TABELA 4.5 – TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO (TD) DO ISOLADO PROTEICO DE QUINOA NOS PHS 3,5 E 7,0, COM E SEM ADIÇÃO DOS ÍONS CÁLCIO E MAGNÉSIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 10% OU 15%.....	71
TABELA 4.6 – VALORES DE G' INICIAIS, APÓS AQUECIMENTO A 90°C E APÓS RESFRIAMENTO ATÉ 20°C.....	77
TABELA 4.7 – VALORES DE G' INICIAIS, APÓS AQUECIMENTO A 90°C E APÓS RESFRIAMENTO ATÉ 20°C.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	Aminoácidos
AT	Análises térmicas
CLSM	Microscopia confocal a laser
DLS	Microscopia de espalhamento de luz estático (SLS) e dinâmico
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Termogravimetria derivada
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinamímico
ICTAC	Confederação Internacional para Análises Térmicas e Calorimetria
IPQ	Isolado proteico de quinoa
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization</i>
MALDI-ToF/MS	Espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF
MM	Massa molar
MVM	Valor de massa combinada
na	Não se aplica
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCS	Cobertura da sequência proteica
PI	Ponto isoelétrico
SLS	Microscopia de espalhamento de luz estático
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina
TG	Termogravimetria
ToF	<i>Time of flight</i> (tempo de voo)
WPC	Capacidade de retenção de água

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca^{2+}	Íon Cálcio
Mg^{2+}	Íon Magnésio
Da	Dalton
M	Molar (mol/L)
S	Siemens
ΔH	Variação da entalpia
ΔG	Variação na energia livre de Gibbs
ΔT	Variação de temperatura
T_D	Temperatura de desnaturação
W	Watts
G'	Módulo de armazenamento de cisalhamento ou módulo elástico
G''	Módulo da perda de cisalhamento ou módulo viscoso
σ_0	Amplitude da tensão de cisalhamento
γ_0	Amplitude da deformação
δ	Deslocamento de fase
η^*	Viscosidade complexa
C^*	Concentração crítica
ω	Frequência
G'_i	Módulo elástico no início do experimento a 20°C
G'_{aq}	Módulo elástico após aquecimento até 90°C
G'_f	Módulo elástico no final do experimento a 20°C
T_G	Temperatura de geleificação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVO	17
1.1.1 <i>Objetivos Específicos</i>	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 QUINOA	18
2.1.1 <i>Cultivo</i>	19
2.1.2 <i>Composição nutricional</i>	20
2.1.3 <i>Fatores antinutricionais</i>	22
2.1.4 <i>Consumo</i>	23
2.1.5 <i>Proteínas de grãos de quinoa</i>	24
2.2 GELEIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	26
2.2.1 <i>Mecanismo de geleificação</i>	27
2.2.2 <i>Fatores que afetam a geleificação</i>	30
2.2.3 <i>Aplicação de géis proteicos em alimentos</i>	34
2.3 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE GELEIFICANTE DE PROTEÍNAS	35
2.3.1 <i>Análises Reológicas</i>	37
2.3.2 <i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	40
2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 MATERIAL	44
3.2 MÉTODOS	44
3.2.1 <i>Obtenção da farinha de quinoa</i>	44
3.2.2 <i>Obtenção do isolado proteico de quinoa (IPQ)</i>	45
3.2.2.1 <i>Estudo da melhor condição de extração das proteínas de quinoa</i>	45
3.2.2.2 <i>Adaptações da condição de extração escolhida</i>	46

3.2.3	<i>Caracterização do isolado proteico de quinoa</i>	48
3.2.3.1	Quantificação de proteínas.....	48
3.2.3.2	Quantificação de carboidrato total	49
3.2.3.3	Determinação da presença de amido.....	49
3.2.3.4	Quantificação do teor de umidade e cinzas.....	50
3.2.3.5	Análise da massa molar das proteínas por eletroforese.....	50
3.2.3.6	Identificação de proteínas por espectrometria de massas	51
3.2.3.7	Determinação da solubilidade do isolado proteico	52
3.2.4	<i>Análise da estabilidade térmica da proteína de quinoa em relação ao pH e adição de sais divalentes</i>	53
3.2.5	<i>Análises reológicas</i>	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1	OBTENÇÃO DO ISOLADO PROTEICO DE QUINOA.....	56
4.1.1	<i>Extração da proteína presente na farinha de quinoa</i>	56
4.1.2	<i>Diálise do isolado proteico de quinoa</i>	59
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO PROTEICO DE QUINOA	61
4.2.1	<i>Eletroforese em condições redutoras e não redutoras</i>	61
4.2.2	<i>Espectrometria de massas MALDI-ToF</i>	63
4.2.3	<i>Caracterização físico-química</i>	65
4.2.4	<i>Determinação da solubilidade do isolado proteico</i>	68
4.3	EFEITO DO PH, TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO NO COMPORTAMENTO GELEIFICANTE DO ISOLADO PROTEICO DE QUINOA.	70
4.3.1	<i>Desnaturação proteica</i>	71
4.3.2	<i>Capacidade geleificante em pH 3,5</i>	73
4.3.3	<i>Capacidade geleificante em pH 7,0</i>	78
4.3.4	<i>Relação entre a geleificação e a desnaturação proteica</i>	83
5	CONCLUSÃO	85
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87
	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICES	102

1 INTRODUÇÃO

A quinoa é um pseudocereal originário da região dos Andes (Chile, Argentina, Peru, Bolívia, Equador e Colômbia), que apresenta grande potencial de expansão devido a sua adaptabilidade a diversos climas e solos. Uma das características de destaque deste grão é a elevada quantidade de proteína com teor elevado de aminoácidos essenciais, podendo ser uma possível substituta para proteínas de origem animal como o leite e a carne.

As principais proteínas da quinoa são a globulina 11S e a albumina 2S. Essas proteínas podem ser extraídas por precipitação isoelétrica e tem um grande potencial de utilização na indústria, pois por meio do seu isolamento, fatores antinutricionais do grão podem ser eliminados. Além disso, apresenta propriedades funcionais, como capacidade de formação de espuma e de emulsificação, e alto valor nutritivo. O fracionamento das proteínas presentes na quinoa permite o máximo aproveitamento do grão separando partes de importância industrial da quinoa, como proteína, amido, lipídeo, etc.

As proteínas governam muitas características sensoriais de alimentos. Conhecer suas propriedades é de extrema importância para a garantia da qualidade sensorial e nutricional do produto final. A capacidade geleificante é uma propriedade funcional exibida em algumas proteínas. Os géis proteicos têm importantes aplicações alimentares uma vez que constituem uma matriz estrutural de retenção de água e de outros ingredientes alimentares como por exemplo gordura, compostos aromáticos e sais minerais. Além disso, podem auxiliar a melhorar as características nutricionais dos alimentos devido ao fornecimento de aminoácidos ou por conferir características sensoriais, em alguns casos, semelhantes aos lipídeos.

Pelas buscas na literatura realizadas neste trabalho, não foram encontrados estudos sobre a capacidade geleificante das proteínas de quinoa, habilidade importante na textura e estrutura dos alimentos. Uma técnica de determinação da capacidade geleificante e caracterização de géis é a reologia oscilatória. Por meio deste método, as mudanças nas propriedades de uma solução, em diferentes temperaturas e tensões de cisalhamento, podem ser

medidas fornecendo parâmetros relacionados com a viscosidade e a elasticidade. Pode-se determinar o tipo de gel formado e a temperatura em que uma amostra passa a ter comportamento de gel.

Para se entender a formação dos géis proteicos, é essencial o conhecimento de sua estabilidade térmica, pois a desnaturação proteica, na maioria dos casos, é necessária à formação da rede de gel. A análise térmica é uma importante ferramenta de caracterização e avaliação do efeito do processamento em proteínas. A técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) permite o conhecimento da temperatura de desnaturação ou de agregação de uma proteína e vem sendo utilizada em associação com a reologia para explicar a formação de géis proteicos.

Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo obter e caracterizar um isolado proteico de quinoa a fim de avaliar a sua capacidade geleificante. Foram estudados o efeito do pH, concentração de proteína e adição de sais na formação de géis proteicos durante etapas de aquecimento e resfriamento..

1.1 OBJETIVO

Os objetivos deste trabalho foram obter e caracterizar de um isolado proteico de quinoa, e avaliar da sua estabilidade térmica e capacidade geleificante.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver uma metodologia de isolamento da proteína de quinoa;
- Determinar a composição físico-química do isolado proteico de quinoa (IPQ);
- Identificar as proteínas presentes no IPQ por meio de espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF
- Verificar a estabilidade térmica do IPQ por meio da Calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Avaliar a capacidade geleificante do IPQ mediante reologia oscilatória;
- Determinar a influência do pH, da concentração de proteína e dos íons divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} na formação de géis proteicos de quinoa;
- Determinar a relação entre desnaturação e geleificação para o IPQ.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Com o objetivo de proporcionar uma maior compreensão dos temas abordados e objetivos propostos, neste capítulo será exposta uma descrição sobre a quinoa, sua forma de cultivo, importância econômica e social, composição e consumo; conhecimentos básicos sobre proteínas como desnaturação e geleificação; e uma descrição das análises térmicas e reológicas que foram utilizadas neste trabalho.

2.1 QUINOA

A quinoa (*Chenopodium quinoa*) é um pseudocereal pertencente à família *Chenopodiaceae*. A região andina, que compreende os países Chile, Argentina, Peru, Bolívia, Equador e Colômbia, é o centro de origem de muitas variedades de quinoa, que por milhares de anos foi o principal alimento das culturas antigas da região (FAO, 2011).

Seu grão possui proteína de qualidade, que atende às necessidades básicas em aminoácidos essenciais, no balanceamento proteico de alimentos e ração animal. Ademais, atende, também, à crescente demanda por alimentos equilibrados e funcionais, relacionada à busca de alternativas dietéticas, como a ausência de glúten (SPEHAR, ROCHA e SANTOS, 2011).

A quinoa tem recebido grande atenção recentemente devido ao seu potencial agrícola e nutritivo, tanto que 2013 foi considerado o Ano Internacional da Quinoa pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), com o objetivo de popularizar ainda mais este grão. A quinoa é considerada pela FAO uma possível promotora da segurança alimentar e a erradicação da pobreza, assim como uma ferramenta no combate à desnutrição e estímulo da biodiversidade.

A seguir serão apresentadas informações acerca do cultivo, estrutura, composição nutricional e antinutricional e consumo da quinoa pelo mundo.

2.1.1 Cultivo

A quinoa é originária das proximidades do lago Titicaca e o seu cultivo expandiu em seguida para todos os países andinos (FAO, 2013 a). A cultura da quinoa mostra uma extraordinária capacidade de adaptação às condições ecológicas extremas: ela pode crescer a partir do nível do mar a quase 4.000m, resiste a temperaturas de -4°C a quase 40°C e umidade relativa de 40% a 88%. A quinoa é extremamente sal-tolerante, capaz de crescer em salinidades superiores a água do mar, mas notavelmente resistente à geada e estresse hídrico. É uma planta muito eficiente em termos de água, produzindo rendimentos aceitáveis, com chuvas de 100 a 200 mm (BOSCAIU e VICENTE, 2013).

Devido à capacidade de adaptação e a alta qualidade nutricional existem hoje muitos estudos sobre o sistema de produção deste grão e a sua adaptação às diferentes condições ambientais. Segundo a FAO (2013 b), os maiores produtores de quinoa são a Bolívia (45% da produção mundial em 2011) e Peru (48% da produção mundial em 2011), porém este grão já é cultivado em países como França, Inglaterra, Suécia, Dinamarca, Holanda, Itália, Estados Unidos, Canadá, Quênia e Índia com bons rendimentos.

No Brasil, desde 1990 a EMBRAPA de Brasília (Recursos Genéticos e Biotecnologia) tem realizado trabalhos pioneiros com a quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) visando adaptá-la ao cultivo no Brasil. Das modificações genéticas da quinoa surgiu a variedade BRS Piabiru, sendo o primeiro registro dessa planta como cultivo granífero no Brasil (SPEHAR e CABEZAS, 2000). A área plantada, ainda que pequena, tem potencial de crescer, para atender à demanda brasileira, hoje suprida pelo produto importado. Preços atrativos fazem aumentar o interesse de produtores, pesquisadores e indústria alimentícia (BORGES *et al.*, 2010).

2.1.2 Composição nutricional

Segundo Mujica e Jacobsen (2006), a quinoa é um alimento ideal para a nutrição humana devido à sua proteína ser de ótima qualidade, com um equilíbrio de aminoácidos essenciais, e por possuir os ácidos graxos essenciais ômega 3, 6 e 9, vitaminas e minerais, tais como cálcio e ferro.

As principais reservas de carboidrato nos grãos de quinoa estão localizadas no perisperma, enquanto que as de proteínas, minerais e lipídeos localizam-se no endosperma e embrião. Ando *et al.* (2002) quantificaram a composição das frações de quinoa e encontraram 57% do total de proteínas e 49% de lipídios totais no embrião. A FIGURA 2.1 apresenta uma representação esquemática do corte longitudinal do grão de quinoa conforme estudado por Prego, Maldonado e Otegui (1998).

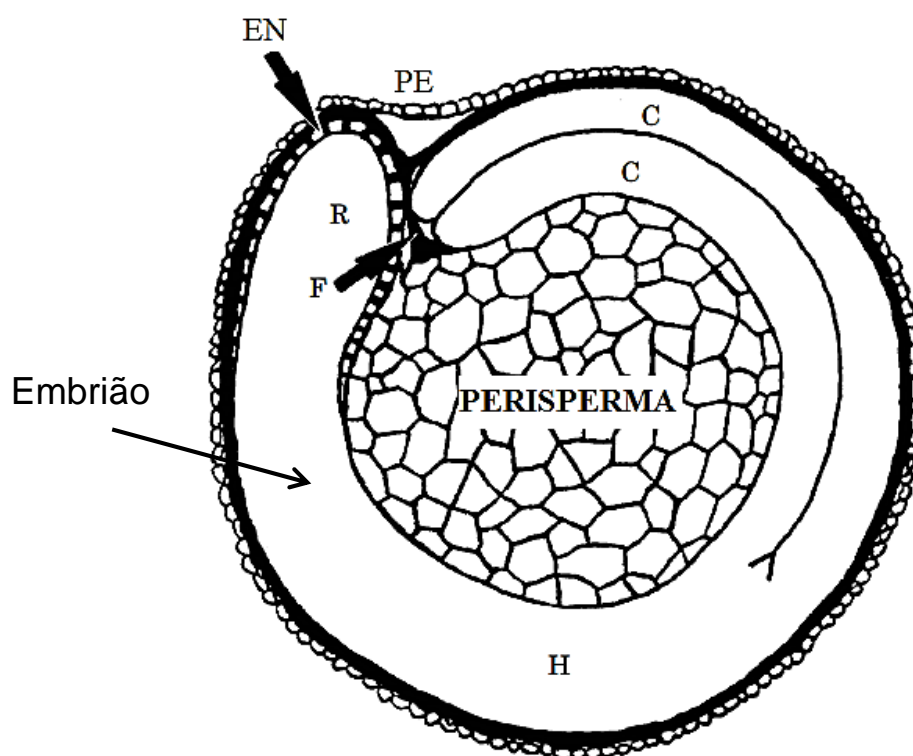


FIGURA 2.1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CORTE LONGITUDINAL DO GRÃO DE QUINOA

FONTE: Prego, Maldonado e Otegui (1998).

NOTA: EN: endosperma, PE: pericarpo, R: radícula, F: funículo, C: cotilédones.

Conforme mostrado na FIGURA 2.1, grão de quinoa é envolto pelo pericarpo que é constituído de duas camadas e o endosperma que confere uma proteção adicional ao embrião. O perisperma é formado por células uniformes de parede fina que armazenam amido. O embrião que rodeia o perisperma, consistiu de um eixo hipocótilo-radícula e dois cotilédones (PREGO, MALDONADO e OTEGUI, 1998). Os grãos de quinoa tem uma forma semelhante a uma esfera achatada e o seu diâmetro médio equivalente varia entre 1,4 a 1,6 mm (VILCHE, GELY e SANTALLA, 2003).

A (TABELA 2.1) apresenta alguns estudos da composição físico-química de grãos de quinoa.

TABELA 2.1 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE GRÃOS DE QUINOA DE DOS PAÍSES BOLÍVIA, BRASIL, CANADÁ E CHILE

Componente	Bolívia ¹	Brasil ²	Canadá ³	Chile ⁴
	(% em base seca)			
Proteína	12,9	17,4	15,2	14,1
Lipídeos	6,5	4,0	7,1	6,7
Cinzas	3,0	2,4	1,4	3,7
Carboidratos	63,7	71,8	65,6	78,8
Fibra bruta	13,9	4,5	10,7	1,6

NOTA: ¹ Ando *et al.* (2002); ² Borges *et al.* (2003); ³ Ogungbenle, Oshodi e Oladime (2009); ⁴ Miranda *et al.* (2012)

Segundo Koziol (1992), que estudou as características nutricionais de diferentes variedades de quinoa cultivados em três zonas geográficas do Chile, os grãos de quinoa tem em média 15% de proteína, 6,3% de lipídeos, 3,49% de cinzas, 63% de carboidrato e 1,79% de fibras. Por meio da TABELA 2.1, que mostra alguns estudos de variedades de quinoa de diferentes países, pode-se notar a variabilidade na composição físico-química para as variedades dos diferentes países estudados. Observa-se que a quinoa da variedade BRS Piabiru estudada por Borges *et al.* (2003), apresentou um teor de proteínas maior do que os valores médios de proteína normalmente encontrados na quinoa e também um teor de lipídeos menor.

Segundo Repo-Carrasco-Valencia *et al.* (2010), a composição nutricional da quinoa varia principalmente de acordo com as diferenças ambientais e variabilidade genética.

Miranda *et al.* (2012) estudaram as características físico-químicas e nutricionais de seis variedades de quinoa cultivadas no Chile e encontraram resultados diferentes para todos os genótipos avaliados. Torrez, Guzman e Carvajal (2002) avaliaram a variação nutricional de 10 variedades de quinoa produzidas na Bolívia e encontraram diferenças entre as variedades analisadas.

Dessa forma, faz-se necessária uma caracterização das diferentes variedades de quinoa a fim de determinar suas principais diferenças para que se utilize um processamento adequado do grão.

2.1.3 Fatores antinutricionais

Os fatores antinutricionais presentes nos grãos de quinoa são saponinas, ácido fítico, taninos e inibidores de tripsina. Estas substâncias encontram-se presentes em maior concentração nas camadas externas do grão, ou seja, no pericarpo e endosperma (KOZIOL, 1992).

Siener *et al.* (2006) determinaram o conteúdo de oxalato (substância que influencia a absorção de minerais e oligoelementos em seres humanos e podem levar à formação de cálculos no trato gastrointestinal) em quinoa e encontraram um teor de 184 mg de oxalato/100g do grão sendo que a ingestão aceitável de oxalato deve estar no intervalo de 50-200 mg por dia.

Ruales e Nair (1993) determinaram os teores de saponinas, ácido fítico, taninos e inibidores de protease presentes em grãos de quinoa da variedade Latinreco-40057, e concluíram que as saponinas e ácido fítico são os dois principais antinutrientes presentes em grãos de quinoa. Os mesmos autores também estudaram a presença desses antinutrientes após a lavagem dos grãos e verificaram que 56% da saponina e 30% do teor de fitato foram removidos.

Segundo Chauhan, Cui e Eskin (1999), a remoção de saponinas realizada em grãos de quinoa antes da extração de proteínas altera suas propriedades

funcionais, diminuindo a solubilidade, a capacidade emulsificante e a formação de espuma dessas proteínas. Dessa maneira, a quinoa da variedade BRS Piabiru tem a vantagem de conter níveis baixos de saponina e assim não dificulta a extração das proteínas ou modifica as suas propriedades funcionais.

Devido aos fatores antinutricionais dos grãos integrais de quinoa, os isolados proteicos podem ser uma alternativa para o consumo dessas proteínas de alto valor nutricional.

2.1.4 Consumo

No Brasil, o consumo de quinoa é limitado em virtude do alto custo do grão importado, de hábitos e costumes do consumo de cereais como arroz, trigo e milho e da baixa disponibilidade de cultivares adaptadas às condições locais. Além disso, a planta e o grão têm sido pouco estudados e seu consumo chega a ser desconhecido pela maioria da população (BORGES *et al.*, 2010).

As descobertas das possíveis aplicações desse versátil pseudocereal são constantes, na indústria alimentícia, novos produtos já estão sendo elaborados ou extraídos, são eles: o “leite” (extrato) de quinoa, quinoa *tempeh* (extrato de quinoa fermentado), concentrados proteicos e corantes naturais (betalaínas, para utilização em alimentos) (BRADY *et al.*, 2007).

Comercialmente, este grão pode ser encontrado nas formas integral ou polido, como farinhas, flocos, *snacks* expandidos ou bebidas. Pode ser consumido cozido, de modo similar ao arroz ou em combinação com outros ingredientes em diferentes preparações alimentícias, em sopas, molhos, cereais matinais, dentre outros (BORGES *et al.*, 2010).

Na literatura existem muitos estudos na utilização de grãos de quinoa em formulações preparadas para celíacos ou para aumentar o valor nutricional de produtos como macarrão (BORGES *et al.*, 2003), biscoitos (PAGAMUNICI *et al.*, 2013), pães (CALDERELLI *et al.*, 2010; ELGETI, 2014), barras de cereal (DEGASPARI *et al.*, 2010) e bolo (SILVA *et al.*, 2010).

Também vem sendo desenvolvidos novos produtos com apelo funcional como bebida fermentada (BICUDO *et al.*, 2012), flocos pré-gelatinizados

(DEGÁSPARI e SILVA, 2010), extrusados (TAVERNA, LEONEL e MISCHAN, 2012), entre outros.

A TABELA 2.2 ilustra as exportações de grãos de quinoa da Bolívia e do Peru em toneladas nos anos 2010-2012.

TABELA 2.2 – EXPORTAÇÕES DE GRÃOS DE QUINOA DA BOLÍVIA E PERU

	Exportada do Peru (toneladas)			Exportada da Bolívia (toneladas)		
	2010	2011	2012	2010	2011	2012
Mundo	4 763	8 020	10 275	15 519	20 366	25 899
Estados Unidos	2 944	5 039	6 662	7 720	10 655	16 342
União Europeia	630	1 135	1 363	5 486	5 856	5 550
Canadá	226	400	592	620	1 339	1 755
Argentina	18	22	20	244	300	261
Austrália	133	320	446	257	496	553
Brasil	25	142	229	473	389	485
Chile	31	99	85	81	132	142
Israel	224	184	380	201	283	429
Japão	136	116	101	81	80	106
Nova Zelândia	85	145	120	-	-	-

FONTE: FAO (2013 b)

A TABELA 2.2 mostra que as exportações de quinoa cresceram nos anos de 2010 a 2012, sendo que o volume dos grãos exportados da Bolívia e do Peru praticamente dobrou em 2 anos. Segundo a FAO (2013 b), os maiores importadores da quinoa são os Estados Unidos e a União Europeia, porém o consumo e as exportações para outros países ao redor do mundo vem crescendo muito nos últimos anos devido principalmente à popularização do seu elevado valor nutricional.

2.1.5 Proteínas de grãos de quinoa

As proteínas de quinoa podem ser um dos ingredientes mais promissores, capazes de complementar as proteínas de cereais ou leguminosas. Além disso,

existe o potencial para a produção de concentrados de proteínas de grãos de quinoa, que poderiam ser utilizados como matérias primas na indústria alimentar (ABUGOCH *et al.*, 2008).

A TABELA 2.3 traz uma comparação do perfil de aminoácidos essenciais da quinoa com outras fontes proteicas e com os padrões da OMS.

TABELA 2.3 - PERFIL DE AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS PRESENTE NA QUINOA E EM PROTEÍNAS DE OUTRAS FONTES

Aa essenciais (mg/g proteína)	Padrão OMS	Carne	Quinoa	Caseína
	(mg/g proteína)			
Histidina	19	34	46	30
Isoleucina	28	48	70	54
Leucina	66	83	73	1,02
Lisina	56	89	84	84
Metionina + Cisteína	25	40	125	35
Fenilalanina + Tirosina	63	80	120	115
Treonina	34	46	57	46
Triptofano	11	12	12	13
Valina	35	50	76	69

NOTA: Alves, Rocha e Gomes (2008).

Quando comparamos o perfil de aminoácidos essenciais da quinoa real com o da caseína (TABELA 2.3), podemos verificar que a quinoa real fornece uma maior quantidade dos aminoácidos essenciais histidina, isoleucina, treonina, valina, dos sulfurados metionina e cisteína, e dos aromáticos fenilalanina e tirosina. Portanto, também pela análise do perfil de aminoácidos essenciais podemos verificar que ela é superior à caseína. Dos nove aminoácidos essenciais, ela supera a caseína em seis (ALVES, ROCHA e GOMES, 2008). Dessa forma, as proteínas de quinoa fornece nutrição similar às proteínas utilizadas na nutrição humana como a carne e o leite. Em relação ao isolado proteico de soja, que apresenta todos os aminoácidos essenciais recomendados pela OMS, a quinoa na sua forma integral apresenta um teor de aminoácidos essenciais mais elevados que esses isolados proteicos, podendo ser uma possível substituta também desse tipo de fonte proteica.

Segundo Brinegar e Goudan (1993), as maiores classes de proteína da quinoa são a globulina 11S e a albumina 2S representando cerca de 37% e 35%, respectivamente, das proteínas totais dos grãos. A albumina 2S apresenta massa molar de 8-9 kDa e a globulina 11S é composta por duas subunidades, uma básica com 22-23 kDa e uma ácida com 32-39 kDa. No *site* do National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2014) é possível encontrar o sequenciamento do genoma da globulina 11S da quinoa, os quais apontam uma massa molar de aproximadamente 54 kDa (nº de acesso: AAS67037, AAS67036, ABI94735 e ABI94736).

Existem estudos com isolados proteicos de quinoa hidrolisados enzimaticamente (ALUKO e MONU, 2003), extraídos em diferentes valores de pH (MANZO, 2006; ABUGOCH *et al.*, 2008) e concentrados por membranas (LINDEBOOM, 2005). Por meio desses estudos concluiu-se que isolados proteicos extraídos em pH elevado podem desnaturar durante o processamento. Além disso, foi observado que hidrolisados proteicos de quinoa podem ter uma solubilidade e capacidade de formação de espuma maior, mas uma capacidade emulsificante e a estabilidade de espuma menor que o concentrado proteico.

Ainda não existem estudos, que sejam do nosso conhecimento, sobre a capacidade geleificante das proteínas de quinoa, capacidade importante para a determinação da aplicação desses isolados pela indústria alimentícia.

2.2 GELEIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Géis de proteínas são definidos como uma rede tridimensional em que interações polímero-polímero e polímero-solvente ocorrem de uma maneira ordenada, resultando na imobilização de uma grande quantidade de água por meio de uma pequena porção de proteína (HUDSON, 1996).

Os géis de proteína são compostos por uma matriz proteica dentro da qual a fase aquosa está contida (AVANZA, PUPPO e AÑÓN, 2005). As propriedades do gel são o resultado de interações complexas entre o solvente e a rede molecular. A água, como solvente, influencia na natureza e magnitude das forças intermoleculares que mantem a integridade da rede polimérica. As moléculas

poliméricas são agregadas em uma imensa molécula com uma estrutura tridimensional (DAMODARAN e PARAF, 1997).

Neste tópico serão abordados os mecanismos de geleificação, os fatores que afetam a capacidade geleificante e a aplicação de géis proteicos na indústria de alimentos.

2.2.1 Mecanismo de geleificação

Em geral, a geleificação é conhecida como um mecanismo de duas etapas. O primeiro passo envolve a desnaturação da proteína e o segundo passo a reorientação da proteína desnaturada em uma rede tridimensional. O método mais comum para a formação de géis alimentares com proteínas globulares é por aquecimento. O processo de geleificação inicia-se quando o calor induz o desdobramento da proteína expondo os seus grupos e/ou locais reativos favorecendo as interações intermoleculares (FOEGEDING, 2006). A FIGURA 2.2 ilustra o mecanismo de geleificação de proteínas induzido pelo calor.

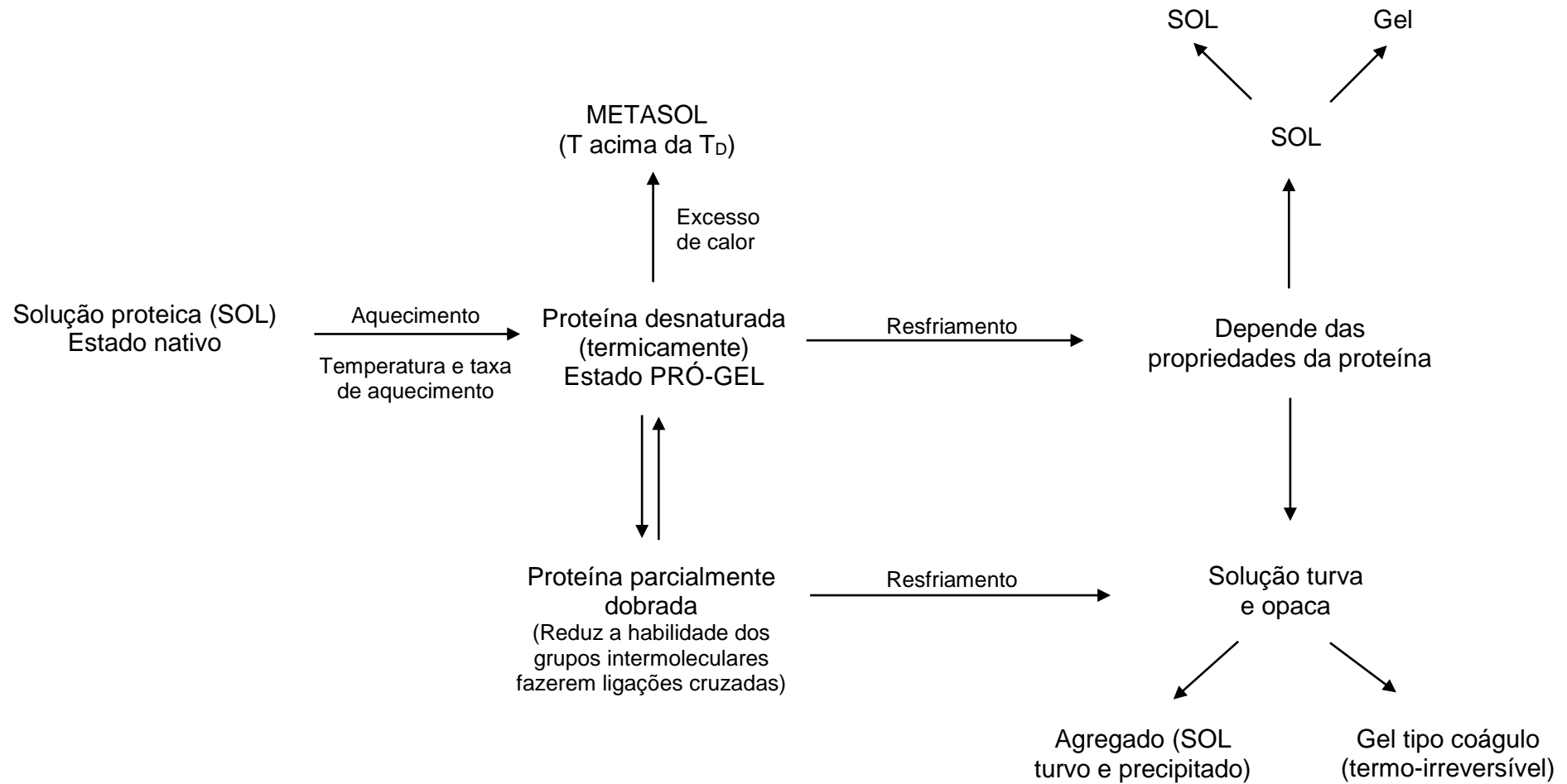


FIGURA 2.2 – ESQUEMA DA GELEIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS GLOBULARES A QUENTE DURANTE ETAPAS DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO.

FONTE: Totosaus *et al.* (2002)

NOTA: T= temperatura, T_D = temperatura de desnaturação.

Segundo Damodaran, Parkin e Fennema (2010), a proteína em estado sol (solução) é transformada em pró-gel por meio da desnaturação. O estado pró-gel é um estado líquido viscoso no qual algum grau de desnaturação proteica e de polimerização já ocorreu, além disso, grupos funcionais como pontes de hidrogênio e grupos hidrofóbicos ficam expostos permitindo a formação da rede proteica. Durante o resfriamento do pró-gel, a energia cinética térmica diminui facilitando a formação de ligações não covalentes estáveis entre os grupos funcionais expostos das diversas moléculas formando o gel proteico conforme esquema apresentado na FIGURA 2.2.

Quando um pró-gel é aquecido acima da temperatura de desnaturação (T_D) ocorre a formação de metasol onde não é possível a formação de gel após o resfriamento. Por exemplo um aquecimento da proteína de soja acima de 100°C causa a desnaturação da estrutura secundária e terciária da proteína dificultando a geleificação (KINSELLA, 1979).

O gel proteico pode ser termorreversível (fundido com aquecimento e geleificado com resfriamento) ou termofixo (uma vez formado pelo aquecimento não irá fundir). Do ponto de vista de sua propriedade física pode ser flexível ou frágil, opaco ou transparente (YADA, 2004). Os géis opacos, chamados géis tipo coágulo, são formados por agregação hidrofóbica durante a desnaturação seguida por associação aleatória dos agregados. A opacidade desses géis se deve ao espalhamento de luz causado pela rede (isotrópica) não ordenada de agregados proteicos insolúveis. Os géis tipo coágulo costumam ser fracos e propensos à sinérese (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

A FIGURA 2.3 mostra um esquema dos tipos de agregados obtidos para diferentes proteínas.

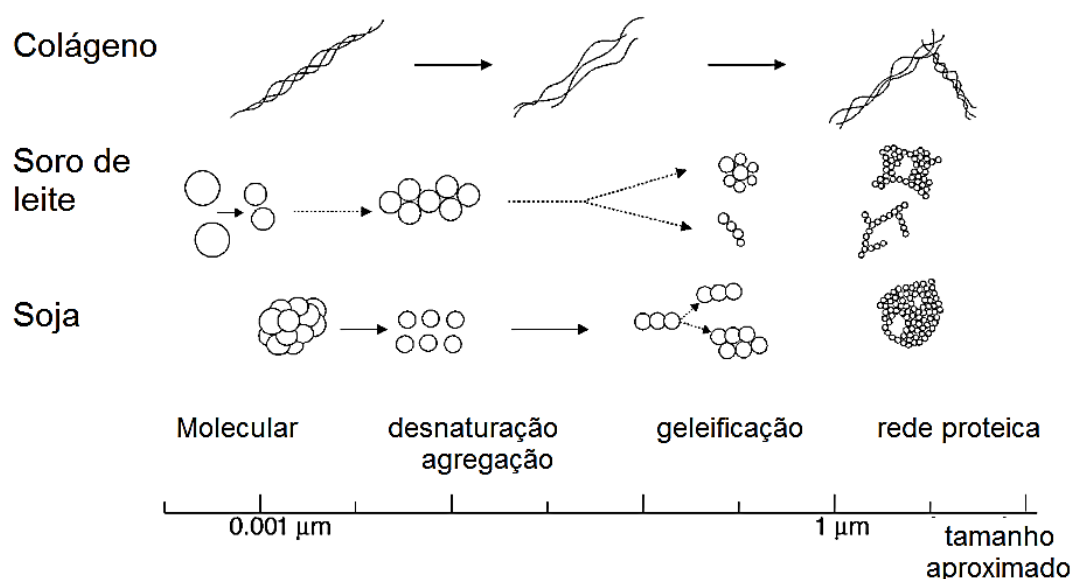


FIGURA 2.3 – ELEMENTOS ESTRUTURAIS FORMADOS DURANTE A GELEIFICAÇÃO DE DIFERENTES PROTEÍNAS
 FONTE: Yada (2004)

Segundo Hermansson (1986), os géis podem ser constituídos de agregados aleatórios ou de géis associados de forma mais ordenada. Na FIGURA 2.3 pode-se observar os elementos estruturais de géis proteicos. Em proteínas como a β -lactoglobulina presente no soro de leite ou as proteínas de soja a agregação dos polipeptídios é aleatória o que resulta na formação de géis opacos. Já em géis formados por colágeno como a gelatina a associação das cadeias polipeptídicas é ordenada dando origem a géis solúveis e transparentes.

2.2.2 Fatores que afetam a geleificação

Os fatores que afetam a geleificação podem ser devido às características da proteína e de acordo com o meio em que esta se encontra. Phillips, Whitehead e Kinsella (1994) definiram os fatores que afetam a geleificação de proteínas como intrínsecos ou extrínsecos conforme TABELA 2.4. Os fatores extrínsecos que afetam significativamente o processo de geleificação são força iônica, concentração de proteína, temperatura de aquecimento, pH e pressão.

TABELA 2.4 – CLASSIFICAÇÃO DOS FATORES QUE INFLUENCIAM NA FORMAÇÃO DE GÉIS PROTEICOS

Fatores intrínsecos	Fatores extrínsecos
Hidrofobicidade	Concentração proteica
Interações eletrostáticas	pH
Pontes dissulfeto	Temperatura
Massa molar	Força iônica e tipo de íon
Composição de aminoácidos	Pressão

Fonte: Phillips, Whitehead e Kinsella (1994)

- *Força iônica*

A força iônica tem efeito significativo na absorção de água, inchamento e solubilidade das proteínas, na medida em que ligações competitivas são criadas (BORDERÍAS e MONTERO, 1988). Os íons afetam a conformação proteica devido a interações eletrostáticas com grupos carregados e grupos polares ou por interações hidrofóbicas entre as moléculas de proteína (DAMODARAN e KINSELLA, 1982). Cátions divalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} , podem ser usados na formação de géis proteicos. Esses íons formam ligações cruzadas entre grupos carregados negativamente de moléculas proteicas (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

- *Concentração de proteína*

Para formar uma rede de gel que se mantenha sozinha exige-se uma concentração mínima de proteína conhecida como o menor ponto de equivalência (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010) ou concentração crítica de geleificação (GOSAL e ROSS-MURPHY, 2000). As interações proteína-proteína tendem a manter a rede tridimensional que determina o gel. Por isso, uma maior concentração de proteína facilitará a formação do gel (SGARBIERI, 1998). Acima da concentração mínima, a relação entre a força do gel, G , e a concentração da proteína, C , segue uma lei exponencial (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010), conforme apresentado na Equação 1:

$$G \propto (C - C_0)^n \quad (1)$$

Onde C_0 é o menor ponto de equivalência ou concentração crítica e n varia de 1 a 2 para proteínas.

- Temperatura de aquecimento

A ação do calor promove a desnaturação proteica e a consequente abertura das cadeias com a exposição de grupos hidrofóbicos que se atraem mutuamente. Concomitantemente, podem se formar ligações cruzadas, tipo ligações dissulfeto que promovem a formação de estrutura tridimensional capaz de aprisionar água e produzir a imobilização do sistema (SGARBIERI, 1998). A geleificação pode ocorrer durante uma etapa de aquecimento ou no resfriamento dependendo das condições da geleificação (YADA, JACKMAN e SMITH, 1994).

- pH

As repulsões eletrostáticas e as interações água-proteína tendem a separar as cadeias polipeptídicas. Dessa forma, pHs maiores que o ponto isoelétrico, onde há maior repulsão de cargas, a geleificação é dificultada. Já as interações proteína-proteína tendem a manter a rede tridimensional formadora do gel (SGARBIERI, 1998).

Dessa forma, acordo com o pH da solução proteica, os géis podem apresentar diferentes características conforme apresentado por Foegeding (2006):

1. Cadeias finas em pH neutro. Formados em pH 7 ou próximo a este valor, e contém pouca, ou nenhuma, adição de sal.
2. Cadeias finas em pH baixo. Formados em pH próximo ou igual a 2 e contém pouca, ou nenhuma, adição de sal.
3. Particulado em pH neutro. Formados em pH próximo ou igual a 7 e em geral a concentração de NaCl é aumentada para mudar a rede de gel de cadeias finas para particulada.

4. Particulado no ponto isoelétrico. Formados em pH próximo ao ponto isoelétrico e assim o pH varia de acordo com o tipo de proteína.

Onde um gel particulado é opaco e tem capacidade de retenção de água baixa e um gel de cadeias finas é transparente ou translúcido e tem uma alta capacidade de retenção de água (FOEGEDING, 2006). Na FIGURA 2.4 é apresentado o estudo realizado por Singh *et al.* (2014), no qual foi avaliada a influência do aquecimento em pH 6,8 e 4,6 com e sem agitação na formação de géis proteicos de concentrado proteico do soro de leite.

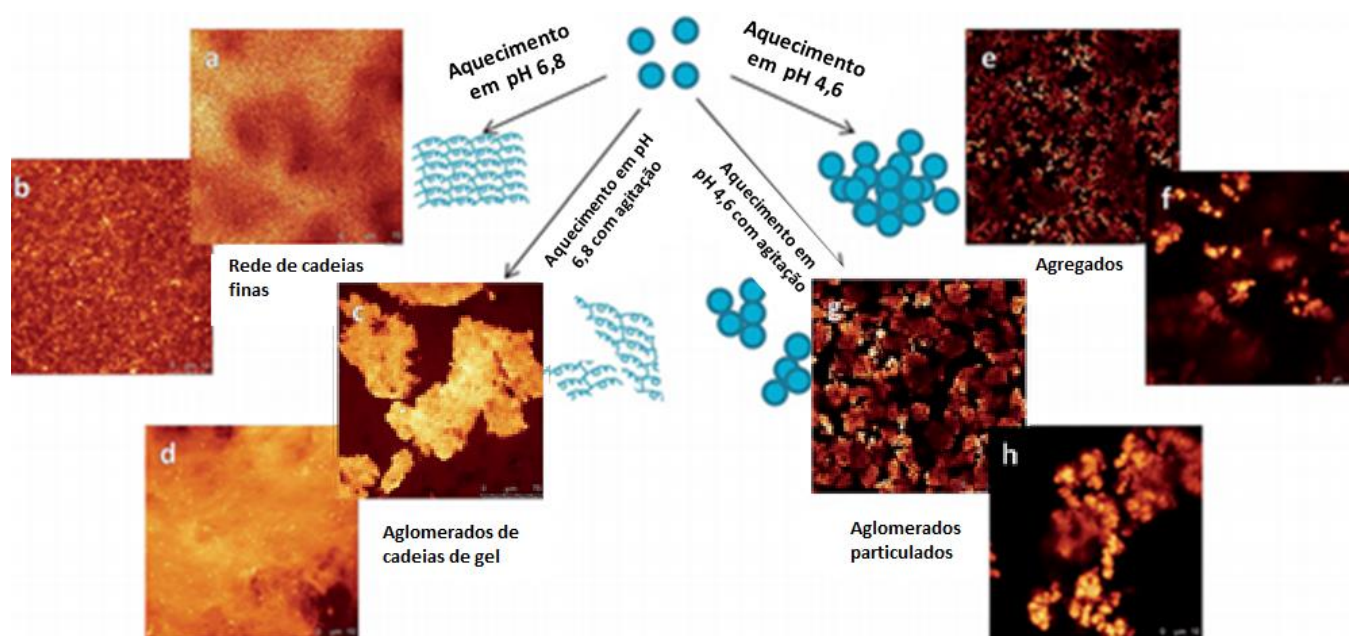


FIGURA 2.4 – DIFERENTES ESTRUTURAS DE GEL FORMADAS EM pH 4,6 E 6,8, COM E SEM AGITAÇÃO.

Fonte: Singh *et al.* (2014).

NOTA: As imagens (a, c, e, g) são de 250 x 250 μm e as imagens (b, d, f, h) são de 50 x 50 μm .

Na FIGURA 2.4 a e b, para um gel proteico de soro de leite produzido em pH 6,8 sem cisalhamento, uma rede de cadeia fina é formada e, quando agitação foi aplicada, o gel obtido consistiu de grandes aglomerados irregulares de proteína (100-500 μm de largura). Por outro lado, o gel de proteína de soro de leite preparado a pH 4,6 sem agitação foi formada por agregados esféricos (FIGURA 2.4 e e f). Estes agregados de proteínas formaram uma rede com poros

de 10-50 μm de largura. Quando cisalhamento aplicado durante a geleificação, a rede de partículas foi dividida em aglomerados maiores na faixa de 50 μm , que continha pequenos agregados de proteína (FIGURA 2.4 g e h) (SINGH *et al.*, 2014).

- Pressão

Dependendo do sistema proteico e das condições sob as quais a pressão é aplicada soluções de proteínas podem formar géis devido ao desdobramento parcial de proteínas quando submetidas a tratamentos com pressão (AHMED *et al.*, 2003). Altas pressões modificam o volume de proteínas nativas, e alteram propriedades como: o volume de átomos constituintes, o volume da cavidade interna e a solvatação (BALNY e MASSON, 1993). Por exemplo, pressões entre 200MPa e 500MPa induzem interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto entre moléculas de proteínas, resultado em um rearranjo da estrutura de um gel (TOTOSAUS, 2002).

2.2.3 Aplicação de géis proteicos em alimentos

A formação de gel é importante em diversos alimentos, conferindo-lhes estrutura e estabilidade (CASTRO, 2003). Alguns alimentos onde a capacidade geleificante é importante são leite, carne, peixe, ovos e produtos de cereais. O tipo de estrutura em rede formada contribui para a textura característica de muitos produtos alimentares (YADA, JACKMAN e SMITH, 1994) como o surimi, o tofu, a gelatina, o queijo, entre outros. Os géis agem ainda como um meio de retenção de água, aromas e outros nutrientes e conferem características reológicas e de textura únicas a sistemas alimentares (KINSELLA, 1979).

As principais tendências para a utilização de géis proteicos em alimentos são (YADA, 2004):

- Desenvolvimento de géis de baixa caloria conferindo propriedades de textura e nutricionais adequadas;
- Possibilidade de formação géis a frio não interferindo em componentes termossensíveis dos alimentos;
- Possível substituto de gordura por conferir características sensoriais, em alguns casos, semelhantes aos lipídeos;
- Possibilidade de desenvolvimento de novos produtos.

O conhecimento das propriedades de geleificação das proteínas é requerido para a substituição de uma proteína por outra em sistemas alimentícios. Durante o processamento de produtos alimentares as condições variam muito de acordo com variações no pH, conteúdo de sais, combinação de ingredientes, etc. Essas variações afetam o processo de formação dos géis, estrutura da rede, propriedades reológicas e capacidade de retenção de água na formação de géis, e variam para cada tipo de proteína e meio em que ela se encontra (RENKEMA, 2004).

2.3 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE GELEIFICANTE DE PROTEÍNAS

O estudo da capacidade geleificante e características de géis proteicos é realizado principalmente por técnicas como análises reológicas, de textura e de microscopia eletrônica de varredura, ótica ou a laser (HUA *et al.*, 2005; LU *et al.*, 2010; RENKEMA, GRUPPEN e VAN VLIET, 2002; RAMOS *et al.*, 2012). Essas técnicas são normalmente associadas às análises de calorimetria exploratória diferencial para determinação da temperatura de desnaturação das proteínas.

Segundo Gosal e Ross-Murphy (2000), os modelos matemáticos explicando o processo de geleificação são baseados na predição de temperatura crítica de geleificação (T_c), na concentração crítica de geleificação (C_0) e no comportamento do módulo elástico G' , que são os principais fatores de controle do processo de geleificação.

A TABELA 2.5 expõe exemplos de trabalhos já realizados, nos quais, os autores estudaram a geleificação de proteínas em diferentes condições de pH, concentração e adição de sais por meio de diferentes técnicas. Os exemplos citados são de proteínas de soja, do soro de leite e amaranto que podem apresentar comportamento similar as proteínas de quinoa devido à sua estrutura globular.

TABELA 2.5 – ESTUDO DA GELEIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SOJA, LEITE E AMARANTO UTILIZANDO DIFERENTES TÉCNICAS

Autor	Preparação do gel	Análises
Proteínas de soja		
Tarone <i>et al.</i> , 2013	10% de proteína; sem ajuste de pH; proteínas: 7S (β -conglucina) e 11S (glicina)	Reologia, WPC, Textura.
Nagato e Tokita, 2011	3 a 5% de proteína; pH 6,8; NaCl (0,6 a 1,8%) e $MgCl_2$ (0,1 a 0,4%); proteínas: 7S (β -conglucina) e 11S (glicina)	Reologia, CLSM
Lu <i>et al.</i> , 2010	Concentração de proteína: 5 a 8%; pH 7; Sais adicionados: $CaCl_2$ (20 a 40mM); Tipo de proteína: globulina 11S.	Reologia, DSC, hidrofobicidade, CLSM
Proteína do soro de leite		
Fitzsimons, Mulvihill e Morris, 2007	Concentração de proteína: 3%; pH: 7; NaCl (0 a 100 mM) Tipo de proteína: β -lactoglobulin and α -lactalbumin	DSC, Reologia.
Phan-Xuan <i>et al.</i> , 2014	40 g/L de proteína; pH 6.9; $CaCl_2$ (0 a 4.3 mM); proteína: b-lactoglobulina	Microscopia dos tipos SLS, DLS, CLSM, TEM
Singh <i>et al.</i> , 2014	10% de proteína; pH 6.8 e 4,6; proteína: β -lactoglobulin (β -Lg), α -lactalbumin (α -La) and bovine serum albumin	Reologia, CLSM
Proteína de amaranto		
Avanza, Puppo e Añón, 2005	5 a 15% de proteína; sem ajuste de pH; proteína: albumina e globulina 11S	Textura, reologia, análise visual.

NOTA: CLSM: microscopia confocal a laser; WPC: capacidade de retenção de água; DSC; TEM: microscopia eletrônica de transmissão; microscopia de espalhamento de luz estático (SLS) e dinâmico (DLS)

Nesse tópico serão abordadas as técnicas de reologia de calorimetria exploratória de varredura, as quais foram utilizadas para o desenvolvimento desse trabalho.

2.3.1 Análises Reológicas

A reologia é o estudo da deformação e fluxo da matéria sob a influência de uma tensão (SHARAMM, 2006). As propriedades reológicas de dispersões de proteína tratam do comportamento quanto à viscosidade, pseudoplasticidade, deformação, rigidez, força de um gel, etc. (YADA, 2004).

O gel exibe a combinação das características, elástica e viscosa, agindo de maneira viscoelástica (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). O método mais utilizado para o estudo de propriedades viscoelásticas de alimentos envolve ensaios oscilatórios. Em um teste dinâmico oscilatório com um reômetro rotacional, a placa superior ou o cone não gira continuamente em uma direção, mas é desviado, alternadamente, em uma função de tempo senoidal de pequeno ângulo α , para a direita e para a esquerda (SCHARAMM, 2006). A FIGURA 2.5 ilustra o sistema cone-placa utilizado em um reômetro rotacional.

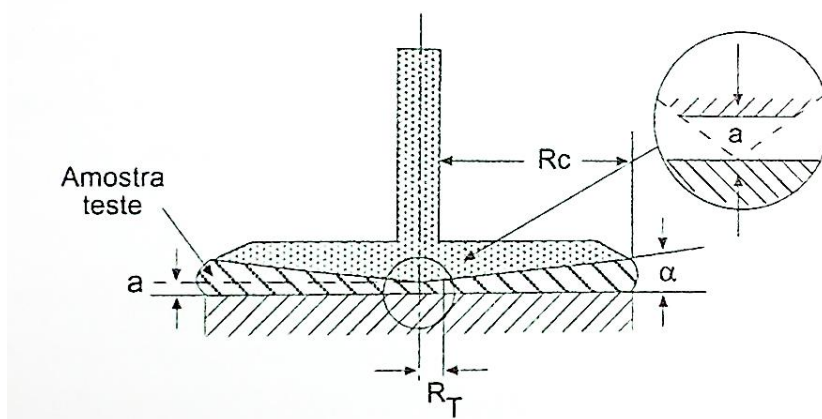


FIGURA 2.5 – SISTEMA CONE-PLACA COM CONE TRUNCADO.

Fonte: Scharamm (2006).

NOTA: R_c – raio externo do cone; α – ângulo do cone; R_T – raio do truncamento; a – altura da ponta removida.

Dois parâmetros independentes são obtidos de testes dinâmicos, o módulo de armazenamento ou módulo elástico (G') e o módulo de perda ou módulo viscoso (G''). Os módulos G' e G'' são expressos em Pascal (Pa), onde G' significa que a energia de tensão é temporariamente armazenada durante o teste, porém pode ser recuperada posteriormente, e G'' indica que a energia usada para iniciar o fluxo é irreversivelmente perdida, sendo transformada em calor de cisalhamento (SCHRAMM, 2006). As Equações 2 e 3 são utilizadas para a obtenção de G' e G'' .

$$G' = \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right) \cos(\delta) \quad (2)$$

$$G'' = \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right) \sin(\delta) \quad (3)$$

Onde: σ_0 é a amplitude da tensão de cisalhamento; γ_0 é a amplitude da deformação e δ é o deslocamento de fase.

Outro parâmetro utilizado no estudo de materiais viscoelásticos é a relação entre os módulos viscoso e elástico, chamado de tangente do deslocamento de fase ou ângulo de fase ($\tan \delta$) que está definida na Equação 4:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (4)$$

Como um gel apresenta um valor de G' maior que G'' , um $\tan \delta$ menor ou igual a 1, representa uma estrutura de gel. Nagano e Tokita (2011) estudaram o comportamento reológico de proteínas de soja e relacionaram a solidez e rigidez do gel com $\tan \delta$, onde um baixo valor ($\tan \delta = 0,12$) foi atribuído a um gel mais sólido e rígido.

A FIGURA 2.6 desenvolvida por Almeida (2002) apresenta a representação gráfica típica de sistemas submetidos a medidas reológicas dinâmicas onde está representada a variação de G' , G'' e η^* em função da frequência aplicada.

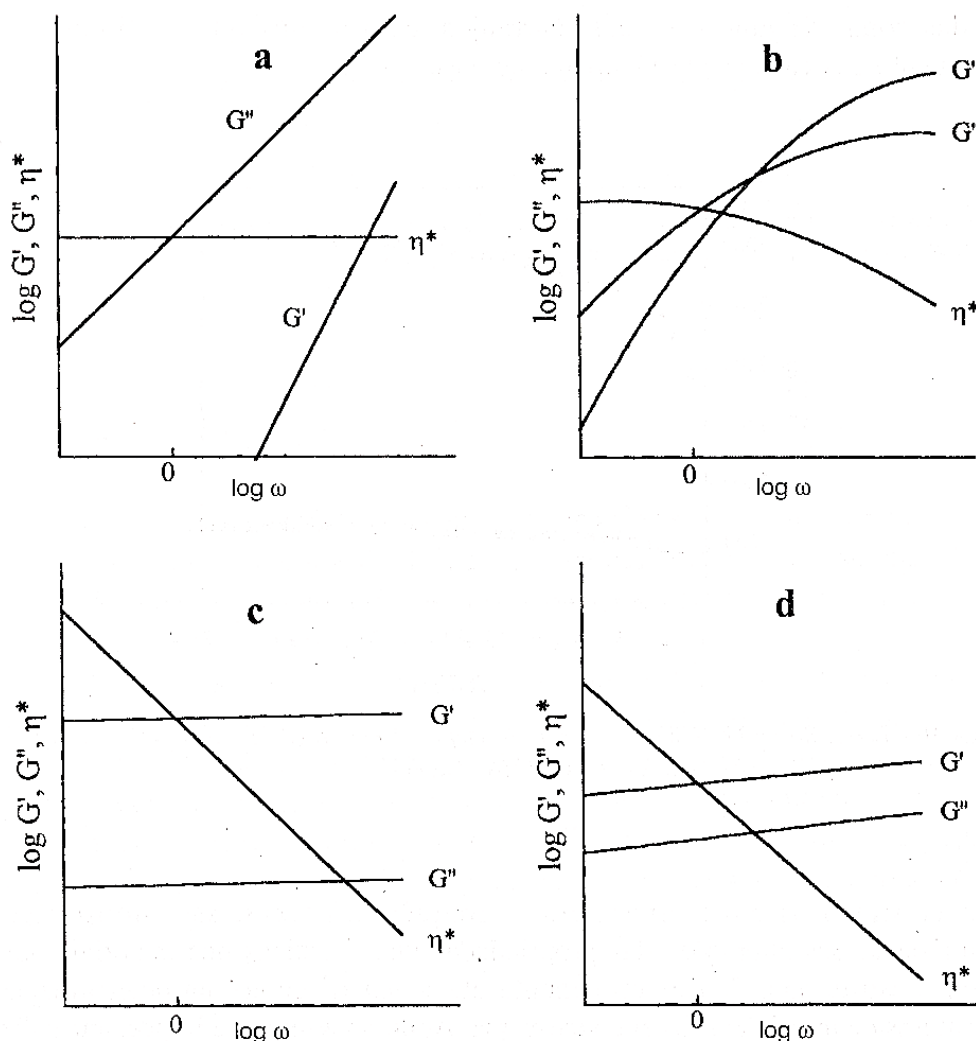


FIGURA 2.6 – ESPECTRO MECANICO TÍPICO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS.

FONTE: Almeida (2002).

NOTA: (a) Solução diluída ($C < C^*$); (b) Solução concentrada ($C > C^*$); (c) Gel forte e (d) Gel fraco. Onde C^* é a concentração crítica do polímero, ω é a frequência aplicada e η^* a viscosidade complexa.

Em soluções diluídas (FIGURA 2.6 a), G'' é maior do que G' em toda a faixa de frequência, mas seus valores aproximam-se em frequências mais elevadas, sendo que a viscosidade complexa não sofre alterações durante a varredura de frequência. As curvas de G' e G'' cruzam-se no meio da faixa de frequência para uma solução concentrada (FIGURA 2.6 b), mostrando uma clara tendência para um comportamento mais sólido em frequências mais altas. A frequência de transição é, por vezes, um critério útil para a avaliação do produto e ocorre quando $G' = G''$. Quando um gel é submetido à varredura de frequência

G' é significativamente maior do que G'' em toda a faixa de frequência analisada (FIGURA 2.6 c e d) (STEFFE, 1996).

Vários critérios são utilizados para a determinação da temperatura crítica de geleificação, tais como o aumento abrupto de G' (BEJARANO-LUJAN, CUNHA e NETO, 2010), aumento de G' acima de 0.5 Pa/min (LAKEMOND *et al.*, 2003), início do aumento de G' (RENKEMA e VAN VLIET, 2002), o cruzamento dos módulos G' e G'' (TARONE *et al.*, 2013) ou um δ (deslocamento de fase) menor que 45° (SANCHEZ e BURGOS, 1997).

Para explicar o fenômeno de geleificação, usualmente uma análise da estabilidade das proteínas ao aquecimento é realizada, que pode ser obtida por meio de calorimetria exploratória diferencial, técnica abordada no próximo tópico.

2.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial pode ser definida como uma técnica que mede as temperaturas e o fluxo de calor associado com as transições de materiais em função da temperatura e do tempo. Tais medidas fornecem informações qualitativas e quantitativas sobre mudanças físicas e químicas que envolvem processos endotérmicos (absorção de calor), exotérmicos (liberação de calor) ou mudanças na capacidade calorífica (MOTHÉ & AZEVEDO, 2009).

A Calorimetria exploratória diferencial vem sendo usada extensivamente para a determinação da temperatura e calor de desnaturação das proteínas (obtido pela variação de entalpia - ΔH). A desnaturação proteica ocorre devido a um desdobramento e desorganização da estrutura secundária e terciária da proteína, sem que ocorra hidrólise das ligações peptídicas. Os agentes desnaturantes incluem calor, solventes orgânicos, agitação mecânica, ácidos ou bases fortes, detergentes e íons ou metais pesados, como chumbo e mercúrio (CHAMPE, HARVEY e FERRIER, 2006).

O mecanismo de desnaturação de proteínas induzido pela temperatura envolve principalmente o efeito da temperatura sobre as interações não covalentes. A TABELA 2.6 mostra a energia envolvida nas diferentes interações

que podem ocorrer entre grupos de proteínas e os grupos envolvidos nas interações.

TABELA 2.6 - PRINCIPAIS INTERAÇÕES RESPONSÁVEIS PELOS NÍVEIS DE ESTRUTURAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Tipo de interação	Energia de interação (kJ/mol)	Grupos envolvidos
Ligação hidrofóbica	3-10	Resíduos apolares
Força de Van Der Waals	1-10	Dipolos induzidos
Ligação hidrogênio	8-40	Grupos amida, carboxila e hidroxila
Interação eletrostática	42-84	Grupos com carga oposta: NH ₃ ⁺ ; COO ⁻
Ponte dissulfeto	320-380	Cisteína

Fonte: Castro (2000)

A estabilidade líquida de uma proteína em determinada temperatura é a soma total das interações envolvidas na estruturação das proteínas, sendo que em meio aquoso a principal interação responsável pela desnaturação proteica é a interação hidrofóbica. As pontes dissulfeto são as mais estáveis a temperatura como pode ser observado na TABELA 2.6 pois elas se opõem a entalpia conformacional da cadeia proteica (DAMODARAN, PARKIN E FENNEMA, 2010).

O calor de desnaturação das proteínas é medido a partir da área do pico da curva de DSC. A temperatura de desnaturação é uma medida da estabilidade térmica das proteínas, e nessa temperatura a mudança na energia livre de Gibbs (ΔG) entre a proteína no estado nativo e no estado desdobrado é zero (DAMODARAN e PARAF, 1997).

Ainda existem poucos estudos sobre a estabilidade térmica das proteínas de quinoa. Manzo (2006) estudou a estabilidade de um isolado proteico de quinoa em pH 9 e 11. O autor encontrou uma menor temperatura de desnaturação para o isolado proteico em pH 11 (96,1°C) do que para o isolado proteico em pH 9 (99,2°C). Abugoch *et al.* (2008), estudaram a estabilidade

térmica de proteínas de quinoa extraídas em pH 9 e 11 e verificaram que a proteína extraída em pH 11 sofreu desnaturação pelo pH e a proteína extraída em pH 9 teve uma temperatura de desnaturação de 98,1°C.

São necessários mais estudos sobre a estabilidade das proteínas da quinoa de diferentes variedades, em diferentes valores de pH ou de acordo com o seu processamento.

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo procurou-se relatar o estado da arte acerca do cultivo e utilização da quinoa em alimentos, bem como o potencial funcional tecnológico das proteínas com maior enfoque na capacidade geleificante. Dessa forma, as técnicas utilizadas na determinação da formação de redes de gel e os fatores que influenciam essa formação foram discutidos.

Este trabalho está inserido na linha de pesquisa estudo termodinâmico por calorimetria (DSC, ITC e TGA) de sistemas compostos por biomoléculas do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFPR. Dentre os trabalhos já desenvolvidos pelo grupo estão os trabalhos: avaliação da interação da β -lactoglobulina-pectina e carboximetilcelulose separadamente por ITC (GOLTZ, 2014); efeitos do congelamento e de crioprotetores na interação entre proteína modelo GlnK e ATP por ITC (MISUGI, 2014); caracterização térmica por DSC das frações ricas em glutenina do trigo obtidas por diferentes métodos de extração (SAVI, 2014) e desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis produzido a partir de proteína isolada de soja, lipídio e surfactantes naturais (CARPINÉ, 2015, não publicado).

Em relação aos objetivos propostos neste trabalho pode-se observar que apesar de existirem muitos estudos relacionados às características nutricionais dos grãos de quinoa e o seu uso como ingrediente de alimentos com apelo nutricional, ainda não existem dados na literatura que sejam do nosso conhecimento acerca da capacidade geleificante das proteínas de quinoa. Além disso, existe a necessidade de estudos que forneçam informações sobre a estabilidade térmica das proteínas de quinoa em diferentes condições, pois com

estas informações pode-se agregar valor ao produto final e o tornar atrativo ao consumidor.

Mediante os dados encontrados na literatura pode-se observar que a técnica de avaliação da capacidade geleificante mais usada é a reologia oscilatória. Esta técnica permite, em um mesmo ensaio, avaliar a viscosidade e elasticidade de uma amostra ao longo de um programa de temperatura controlado. Em relação às análises térmicas, observou-se que essas técnicas são promissoras para a definição de características térmicas de amostras devido à rapidez e pequena quantidade de amostra utilizada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais utilizados neste trabalho e a descrição dos métodos de análise e obtenção do isolado proteico de quinoa bem como as técnicas de verificação da capacidade geleificante e estabilidade térmica das proteínas de quinoa.

3.1 Material

A quinoa utilizada neste trabalho foi proveniente da Embrapa Cerrados da variedade BRS Piabiru. Utilizou-se a água tipo 1 (água deionizada purificada em um sistema Milli-Q, *Millipore Corporation*) para as análises térmicas e reológicas. Todos os reagentes foram de grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção da farinha de quinoa

Os grãos de quinoa foram armazenados em embalagem a vácuo em temperatura ambiente até a sua moagem. Previamente à moagem, realizou-se a limpeza dos grãos de quinoa em peneira para retirada de contaminantes, seguida por lavagem (25°C por 20 min em água corrente) e secagem a 50°C. Os grãos foram triturados em moinho de facas tipo . A farinha obtida foi separada utilizando uma peneira de 80 mesh (177µm) para padronização e melhor eficiência na extração das proteínas, devido ao menor tamanho de partículas. As frações de farinha retida e que passou pela peneira foram separadas, embaladas a vácuo e armazenadas em ambiente fresco e arejado até o momento de sua utilização. Sendo que para a extração do isolado proteico de quinoa utilizou-se a fração menor ou igual a 177µm.

3.2.2 Obtenção do isolado proteico de quinoa (IPQ)

Para a escolha da melhor condição de extração de proteínas de quinoa reproduziu-se técnicas de extração dessas proteínas encontradas na literatura forma reproduzidas (Brinegar e Goudan, 1993; Aluko e Monu, 2003). Os fatores que foram levados em consideração para a escolha foram ausência de amido nas amostras, pois este pode mudar as características geleificantes do isolado proteico, o rendimento e a ausência de proteínas de menor massa molar.

A partir disso, a condição de extração de proteínas de quinoa escolhida foi adaptada com a finalidade de se estudar a sua estabilidade térmica e capacidade geleificante.

3.2.2.1 Estudo da melhor condição de extração das proteínas de quinoa

Neste estudo utilizou-se a farinha de quinoa com granulometria menor que 80 mesh. O isolamento das proteínas da quinoa foi realizado utilizando as metodologias desenvolvidas por Brinegar e Goudan (1993) e Aluko e Monu (2003) com algumas adaptações. O pH de precipitação escolhido foi 5, valor próximo ao ponto isoelétrico da globulina 11S (Brinegar e Goudan, 1993).

A TABELA 3.1 apresenta os parâmetros utilizados para os ensaios de isolamento de proteínas de quinoa, os quais foram realizados isoladamente.

TABELA 3.1 – PARÂMETROS UTILIZADOS PARA ISOLAMENTO DE PROTEÍNAS DE QUINOA

Experimento nº	Farinha	NaCl (mol/L)	pH de solubilização	pH de precipitação
1	Deslipidificada com hexano	0,5	8	5
2	Integral	0,5	8	5
3	Deslipidificada com hexano	0	9	5
4	Integral	0	9	5
5	Deslipidificada com acetona	0	9	5
6	Deslipidificada com acetona	0,5	8	5

Para a deslipidificação da farinha de quinoa realizou-se uma suspensão de farinha em hexano (MANZO, 2006) ou acetona na proporção de 10% (BRINEGAR e GOUDAN, 1993), a qual foi mantida sob agitação em temperatura controlada ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 24 horas. A farinha de quinoa deslipidificada foi seca em temperatura ambiente.

Realizou-se uma suspensão de 10% de farinha de quinoa em água destilada para os experimentos 3, 4 e 5. Para os experimentos 1, 2 e 6 utilizou-se solução de NaCl 0,5 M. O pH da suspensão foi ajustado em 8-9 com solução NaOH 1N, conforme o planejamento. As suspensões foram mantidas sob agitação por 30 minutos e então centrifugadas a 4.700 g por 20 minutos. O pH do sobrenadante foi alterado para 5 utilizando HCl 1N e então realizou-se uma nova centrifugação a 4.700 g por 20 minutos. O precipitado foi solubilizado em tampão Tris (pH 8) para a quantificação de proteínas por meio da análise descrita por Bradford (1976). O isolado proteico foi caracterizado por eletroforese (item 3.2.2.5).

3.2.2.2 Adaptações da condição de extração escolhida

A condição de extração escolhida para os objetivos desse trabalho foi a condição referente ao experimento 2, com solubilização em 0,5 M de NaCl e pH 8,0 com precipitação em pH 5,0. A FIGURA 3.1 apresenta o fluxograma

escolhido para obtenção do isolado proteico de quinoa para realização das análises propostas neste estudo.

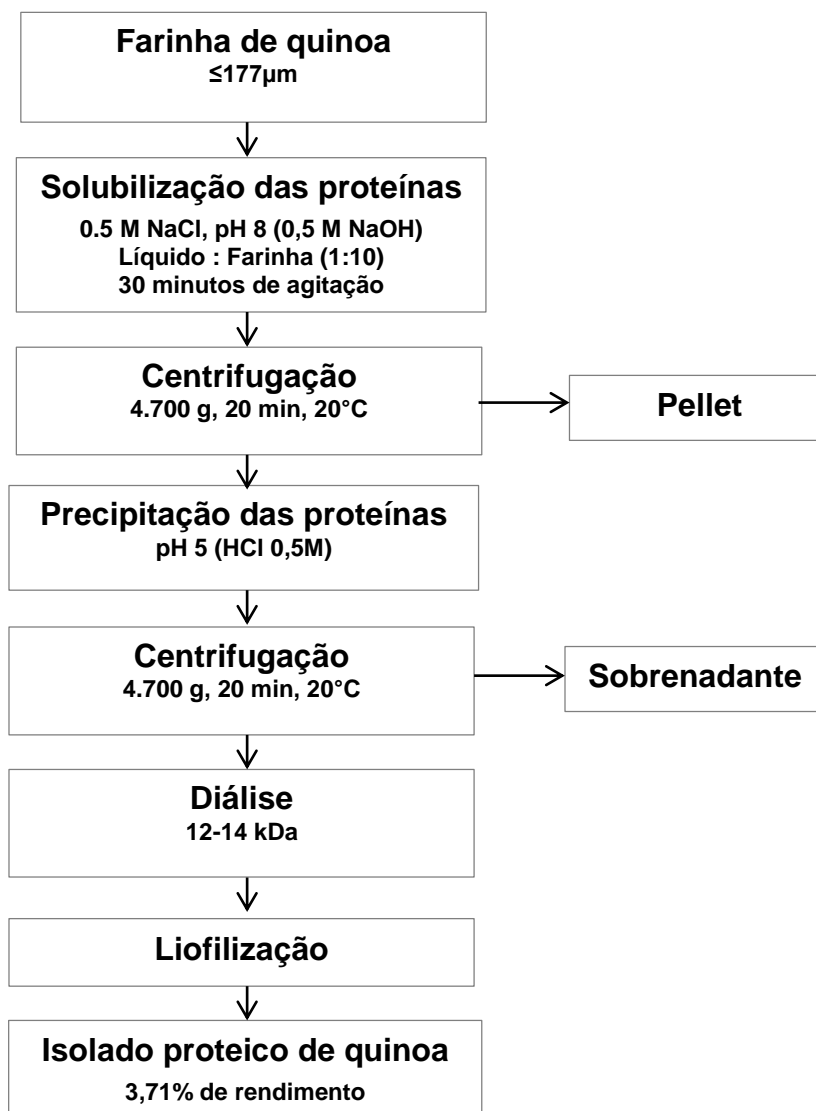


FIGURA 3.1 – FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DO ISOLADO PROTEICO DE QUINOA

Realizou-se diálise aberta do precipitado proteico de quinoa a fim de eliminar o sal presente na amostra. A diálise foi realizada contra água destilada em membrana com limite de exclusão de 12-14 kDa a 4°C sob agitação. A retirada de NaCl da amostra foi acompanhada por meio de um condutivímetro (OAKTON, modelo COM 700). Primeiramente foi construída uma curva a fim de determinar a concentração de NaCl por meio da condutividade, a cada diálise

mediu-se o conteúdo de sal e construiu-se uma curva, a diálise foi considerada suficiente quando o valor de condutividade do meio estava em torno de 20 μ S que corresponde a 5,23 mg/L de NaCl. O isolado proteico liofilizado foi armazenado em dessecador até o momento de sua utilização.

3.2.3 Caracterização do isolado proteico de quinoa

A caracterização do isolado proteico de quinoa foi realizada por meio da quantificação de proteínas, carboidratos, cinzas e umidade. Também realizou-se eletroforese e espectrometria de massas com a finalidade de identificar quais proteínas estavam presentes no isolado proteico.

3.2.3.1 Quantificação de proteínas

Para as amostras proteicas solúveis, como na determinação da solubilidade do isolado proteico, a concentração das proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Esse método colorimétrico é baseado na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 com proteínas. O sistema de reação continha 170 μ L da solução do corante (solução Bradford – 10 mg/L Coomassie Brilliant Blue G-205, 95% etanol e 85% ácido fosfórico para 1 L de solução), 28 μ L de água Mili-q e 2 μ L da amostra. Essa mistura foi homogeneizada e a absorbância foi medida a 595 nm. A curva padrão foi construída utilizando albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações de 0,6 mg/ml; 1 mg/ml; 2 mg/ml; 3 mg/ml; 4 mg/ml e 6 mg/ml.

A determinação de proteínas totais para amostras insolúveis, como a farinha de quinoa, o resíduo da extração e o isolado proteico liofilizado, foi realizada pelo método Kjeldahl (AOAC, 2005). Este método determina nitrogênio orgânico total e baseia-se no aquecimento da amostra com ácido sulfúrico e catalisador para a digestão até que o carbono e o hidrogênio sejam oxidados. O fator de correção, que relaciona a quantidade de nitrogênio encontrado com a

porcentagem de proteína presente na amostra, utilizado neste estudo foi de 5,85 conforme Valenzuela, Abugoch e Tapi (2013).

3.2.3.2 Quantificação de carboidrato total

A dosagem de carboidrato total foi feita pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Esta técnica se baseia na formação de hidroximetilfurfural ou furfural, devido à ação do ácido sulfúrico, que reage com o fenol formando uma coloração amarela. Para as análises utilizou-se como padrão a glucose (200µg/ml). O sistema de reação foi composto de 0,5 ml da amostra do isolado proteico (1mg/ml), 0,5 ml de fenol 5% e 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado.

3.2.3.3 Determinação da presença de amido

O amido pode ser o principal contaminante da proteína isolada de quinoa, pois ele consegue solubilizar-se no pH de extração e pode interagir e precipitar juntamente com a proteína. O amido tem capacidade geleificante o que poderia mascarar os resultados da capacidade geleificante das proteínas de quinoa. A presença de amido foi determinada de forma qualitativa por meio do teste do lugol conforme descrito por IAL (2008). A solução de lugol foi preparada dissolvendo-se 1 g de iodo em 10 ml de água contendo 3 g de iodeto de potássio, o volume foi completado para 50 ml com água e a solução armazenada em frasco âmbar.

A solução proteica foi aquecida em banho-maria por 1 hora e resfriada até temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 0,5 ml de Lugol à solução contendo a amostra e avaliou-se visualmente a coloração formada sendo que a cor azul foi atribuída à presença de amido.

3.2.3.4 Quantificação do teor de umidade e cinzas

O teor de umidade e cinzas foi determinado por meio de termogravimetria no equipamento TG (Netzsch/TG-209/Alemanha, PerkinElmer). O isolado proteico de quinoa liofilizado (~15mg), condicionado em panelinha de cerâmica, foi aquecido de 30°C a 900°C (10°C/min) em atmosfera de ar sintético, com um fluxo de 20 ml/min. O teor da umidade da amostra foi determinado pela perda de massa observado por meio do primeiro pico obtido nas curvas de DTG e o teor de cinzas foi considerado a massa residual ao final da análise. As análises foram feitas em triplicata.

3.2.3.5 Análise da massa molar das proteínas por eletroforese

Para a visualização de proteínas de menor massa molar, como a albumina 2S (8-9 kDa), nos extratos proteicos de quinoa foi utilizado gel desnaturante tris-tricina-SDS. Para a caracterização do isolado proteico de quinoa na condição de extração escolhida utilizou-se o gel desnaturante tris-glicina-SDS em condições redutoras e não redutoras.

O gel desnaturante Tris-Tricina-SDS foi preparado segundo Schagger e Von Jagow (1987). O gel separador foi composto por acrilamida 15% (relação acrilamida:bis-acrilamida 29:1), Tris-HCl 1 mol/L pH 8,45, SDS 0,1%, glicerol 15%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%. O gel empilhador continha acrilamida 4%, Tris-HCl 750 mmol/L pH 8,45, SDS 0,075%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%. Os géis foram submetidos a corridas de 2 horas a 100 V nos tampões catodo (Tris 100 mmol/L, tricina 100 mmol/L, SDS 0,1%, pH 8,25) e anodo (Tris 200 mmol/L pH 8,9).

A eletroforese em gel desnaturante Tris-Glicina-SDS foi realizada em gel de poliacrilamida desnaturante conforme protocolo descrito por Laemmli (1970). A concentração do gel separador utilizado em todas as eletroforeses de proteína foi de 12% (m/v) e do gel de empilhamento foi de 4%. As amostras foram misturadas com tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L de Tris-HCl pH 6,8, 5% de β -mercaptoetanol) e

fervidas antes da aplicação. A voltagem da corrida variou de 100 V a 200 V, utilizando o tampão Laemmli (3 g/L de Tris-base, 14 g/L de Glicina e 1 g/L de SDS). Após a eletroforese, as proteínas do gel foram coradas com corante Coomassie Blue R-250 e descorados em uma solução com 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético. Também foram feitos testes com o mesmo sistema de análise, porém com tampão de amostra em condições não desnaturantes, com ausência de SDS e β -mercaptoetanol.

3.2.3.6 Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Com a finalidade de comprovar a identidade das bandas proteicas visualizadas no gel de eletroforese do isolado proteico de quinoa obtido neste estudo, realizou-se espectrometria de massa do tipo MALDI-ToF das bandas recortadas do gel. O espectrômetro do tipo MALDI-ToF utiliza MALDI (ionização induzida a laser e assistida por matriz) como fonte de íons e está acoplado a um analisador de massas tipo tempo de voo, ToF (*Time of Flight*). Este equipamento identifica o tempo de voo (tempo de deslocamento dos peptídeos ionizados) de uma série de peptídeos obtidos pela digestão enzimática com sítio de digestão específico, e de acordo com esse tempo é determinada a massa/carga de cada peptídeo (SILVEIRA, 2009).

Neste trabalho, as bandas recortadas com as proteínas a serem identificadas foram descoradas com solução contendo 75 mmol/L de bicarbonato de amônio e 40% de etanol. Em seguida, o gel foi desidratado com acetonitrila 100%. O gel foi seco em câmara de vácuo, e reidratado com solução de tripsina (10 μ g/ml) em tampão 40mmol/L de bicarbonato de amônio e 10% de acetonitrila. Essa mistura foi incubada durante a noite a 37°C para que a tripsina gerasse peptídeos a partir da proteína da banda. Dois microlitros da solução de peptídeos resultante foi retirada, misturada a igual volume de solução saturada da matriz HCCA (Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico). A mistura foi colocada sobre uma placa metálica.

Para a obtenção das massas molares dos peptídeos foi utilizado um espectrômetro de massas tipo MALDI-ToF/MS (Espectrometria de massas com

ionização a laser com tempo de voo) (Bruker Daltonics no modo refletor positivo. A calibração do espectrômetro foi realizada com uma mistura de padrões fornecida pelo fabricante (Bruker Daltonics). Os espectros de massa gerados foram analisados no programa FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics).

Foi utilizado o programa *Mascot* 2.5.1 para identificação de proteínas, onde as massas molares dos peptídeos obtidos por MALDI-ToF/MS foi comparado com um banco de dados *online*. O *software* calcula o *score* proteico fornecido pela Equação 5, onde *scores* proteicos maiores que 75 são considerados significativos ($p < 0,05$).

$$Ps = -10 \times \log(P) \quad (5)$$

Onde *Ps* é o *score* proteico e *P* é a probabilidade do resultado observado ser aleatório.

3.2.3.7 Determinação da solubilidade do isolado proteico

A solubilidade está relacionada com todas as propriedades funcionais das proteínas e seu potencial tecnológico de uso em produtos alimentares (CASTRO, 2003). Além disso, para se entender a precipitação e a desnaturação ocasionadas pela mudança de pH, é conveniente que se tenha antes uma visão da solubilidade das proteínas em meio aquoso em função do pH (FARFÁN, 1990). Neste trabalho, a solubilidade do isolado proteico de quinoa foi determinada segundo Abugoch *et al.* (2008) com algumas adaptações. Dispersões de proteína a 1% em tampão 0,1 M com valores de pH variando de 3 a 11 (tampão fosfato do pH 2 ao 7, tampão Tris-HCl para o pH 8, tampão borato para o pH 9 e tampão bicarbonato de sódio para os pHs 10 e 11) e força iônica de 0,3 (ajustada com NaCl calculada por meio do *software* Buffer Maker versão 1.1) foram agitadas em vortex de maneira intensa e breve a cada 15 minutos durante uma hora. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas (Centrífuga Excelsa® II Modelo 206 BL FANEM®) a 2.500 g durante 30 minutos. A proteína

remanescente no sobrenadante foi quantificada pelo método descrito por Bradford (1976).

3.2.4 Análise da estabilidade térmica da proteína de quinoa em relação ao pH e adição de sais divalentes

A estabilidade térmica do isolado proteico de quinoa (IPQ) foi determinada por meio do calorímetro exploratório diferencial (DSC, Perkin Elmer 8500, Shelton, EUA) equipado com o software Pyris (versão 11.1.0.0488). As análises foram realizadas conforme metodologia descrita por Savi (2014) com algumas adaptações. A atmosfera utilizada foi de nitrogênio com fluxo de 50ml/min. A amostra foi aquecida de 5°C a 90°C a uma taxa de 2°C/min. Uma panelinha vazia foi utilizada como referência e para a amostra foi utilizada panelinha padrão de alumínio aberta. A quantidade de amostra utilizada na análise foi de ~ 7 mg. A temperatura de desnaturação (T_D) obtida foi o valor correspondente ao pico máximo de transição conforme exemplificado na. As determinações foram realizadas em duplicata. Foi testada a estabilidade térmica do isolado proteico nos pHs 3,5 e 7, em concentrações de 10 e 15% (m/m) e com adição de cloreto de cálcio ou cloreto de magnésio conforme Tabela 3.2.

TABELA 3.2 – CONDIÇÕES DE pH, % DE ISOLADO PROTEICO DE QUINOA E ADIÇÃO DE SAL TESTADAS UTILIZADAS PARA AS ANÁLISES DE DSC E DE REOLOGIA OSCILATÓRIA.

Amostra n°	pH	% IPQ (m/m)	Sal (55mmol/g)
1	3,5	10	-
2	3,5	10	CaCl ₂
3	3,5	10	MgCl ₂
4	3,5	15	-
5	3,5	15	CaCl ₂
6	3,5	15	MgCl ₂
7	7,0	10	-
8	7,0	10	CaCl ₂
9	7,0	10	MgCl ₂
10	7,0	15	-
11	7,0	15	CaCl ₂
12	7,0	15	MgCl ₂

3.2.5 Análises reológicas

As análises reológicas foram realizadas em reômetro Haake Mars II (Thermo Electron GmbH, Alemanha) acoplado a um banho termostatizado Haake K15, termocirculador de água DC5B3 Haake e uma unidade de controle de temperatura Peltier (TC 81, Haake). O efeito da temperatura na formação do gel foi avaliado para concentrações de isolado proteico de quinoa de 10% (m/m) e 15% (m/m), pH de 3,5 e 7,0 (ajustado com HCl ou NaOH) e adição dos sais MgCl₂ e CaCl₂ na concentração de 55 mmol/g (Luvielmo e Antunes, 2002) conforme apresentado na Tabela 3.2. Para o preparo das amostras, as suspensões de IPQ foram submetidas à agitação *overnight* a 5°C. Previamente à análise, as amostras foram mantidas a 20°C por 30 min na sala do reômetro para estabilização da temperatura.

O sensor utilizado foi do tipo cone-placa com diâmetro de 60 mm e ângulo do cone de 2° (C60 2°/TiL). A frequência foi de 1Hz e deformação máxima de 1%. Os módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') foram medidos em

função da uma rampa de temperatura. A amostra foi aquecida de 20°C a 90°C a uma taxa de 2°C/min, em seguida, resfriada até 20°C na mesma taxa. Uma campânula foi usada para evitar evaporação de água. Os experimentos foram realizados em duplicata.

As curvas da varredura de temperatura foram ajustadas e diferentes equações por meio do *software* Origin 6.0 sendo que a equação que teve melhor ajuste aos dados obtidos foi a equação sigmoidal de Boltzmann a qual está descrita na Equação 6:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2 \quad (6)$$

Onde A_1 é a assíntota horizontal esquerda, A_2 a assíntota horizontal direita, dx a constante de tempo e x_0 o ponto de inflexão. O ponto de inflexão (ponto no qual ocorre a taxa máxima de variação da função) foi considerado como um indicativo da temperatura de geleificação das amostras devido a esta ser a temperatura onde há uma maior variação do módulo viscoso (Gosal e Ross-Murphy, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção do isolado proteico de quinoa

A fim de se determinar a melhor condição de extração das proteínas de quinoa, foram realizadas análises levando em consideração a presença de amido, o rendimento e a características das proteínas isoladas por diferentes métodos.

4.1.1 Extração da proteína presente na farinha de quinoa

A TABELA 4.1 apresenta o rendimento bruto, determinado por meio de Bradford, das diferentes metodologias de extração de proteínas da farinha de quinoa. Pode-se verificar que o maior rendimento para a extração de proteínas foi na ausência de NaCl, isso pode ter ocorrido devido às soluções salinas solubilizarem principalmente globulinas, sendo que as albuminas podem ficar insolúveis neste meio (SGARBIERI, 1998).

TABELA 4.1 – RENDIMENTO DE PROTEÍNA EXTRAÍDA DA FARINHA DE QUINOA

Experimento	Rendimento bruto (%) ¹
1	3,99
2	5,00
3	8,30
4	7,01
5	7,77
6	4,91

¹ g de proteína/ 100g de farinha determinado segundo Bradford (1976)

A FIGURA 4.1 apresenta o resultado da eletroforese com o gel de tris-tricina-SDS para os extratos de proteína isolada de quinoa. Não foi possível realizar a eletroforese da amostra referente ao experimento de número 1 (farinha deslipidificada com hexano e solubilização em pH 8,0 e 0,5M de NaCl), pois a

quantidade de proteína solúvel obtida na extração foi insuficiente para a detecção no gel.

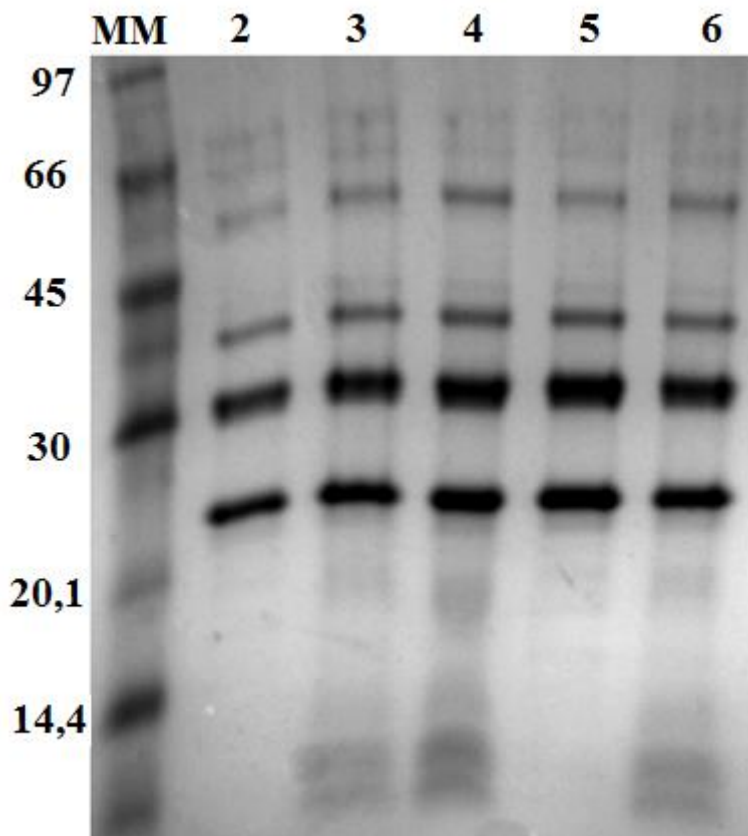


FIGURA 4.1 – ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE TRIS-TRICINA-SDS REALIZADA PARA AS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DA QUINOA.

NOTA: MM – marcadores de massa molar; 2 – farinha integral, solubilização em pH 8 com 0,5 M de NaCl; 3 - farinha deslipidificada com hexano, solubilização em pH 9; 4 - farinha integral, solubilização em pH 9; 5 - farinha deslipidificada com acetona, solubilização em pH 9; 6 - farinha deslipidificada com acetona, solubilização em pH 8 com 0,5 M de NaCl.

Brinegar e Goudan (1996) estudaram a proteína 2S de quinoa e encontraram polipeptídios com massa molar de 8-9 kDa. Por meio da eletroforese realizada em gel desnaturante Tris-Tricina-SDS, observou-se que os procedimentos de extração de proteínas 2 (farinha integral e solubilização em solução salina e pH 8,0) e 5 (farinha deslipidificada com acetona e solubilização em pH 9,0) isolou-se principalmente a proteína 11S (bandas de 22-23kDa e 32-39 kDa) pois bandas de menor massa molar não são visualizadas no gel.

Segundo Damodaran, Parkin e Fennema (2010) proteínas globulares com massa molar menores que 23 kDa não podem formar géis produzidos pelo calor

em nenhuma concentração proteica razoável, dessa forma, nesse estudo é preferível que o isolado proteico de quinoa contenha principalmente proteínas de massa molar maiores para o estudo da geleificação dessas proteínas.

Como o objetivo desse trabalho foi estudar a capacidade de formação de géis das proteínas de quinoa, a metodologia de extração de proteínas priorizou a ausência de amido, devido a capacidade de formação de géis que esse carboidrato apresenta podendo mascarar os resultados obtidos. A FIGURA 4.2 apresenta uma imagem do teste do amido com lugol realizado nos extratos proteicos de quinoa por meio de metodologia descrita por IAL (2008).

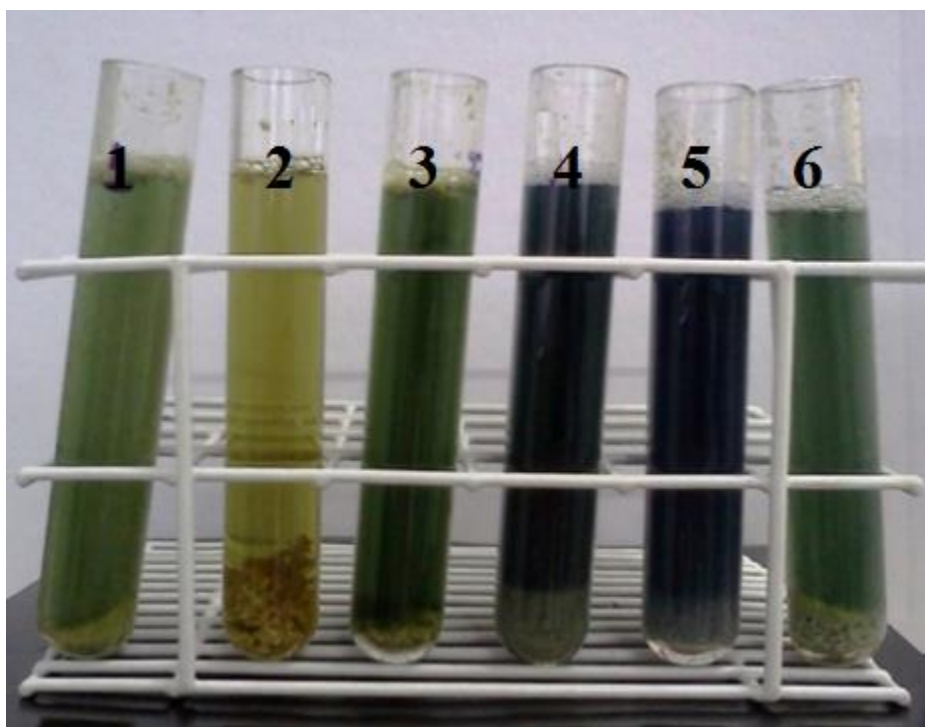


FIGURA 4.2 – TESTE DO AMIDO PARA OS DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA DE QUINOA.

NOTA: 1 – farinha deslipidificada com hexano, solubilização em pH 8 com 0,5 M de NaCl; 2 – farinha integral, solubilização em pH 8 com 0,5 M de NaCl; 3 - farinha deslipidificada com hexano, solubilização em pH 9; 4 - farinha integral, solubilização em pH 9; 5 - farinha deslipidificada com acetona, solubilização em pH 9; 6 - farinha deslipidificada com acetona, solubilização em pH 8 com 0,5 M de NaCl

A FIGURA 4.2 indica que a amostra onde a condição de extração 2 (solubilização em solução salina e pH 8 com farinha de quinoa integral) não houve contaminação por amido (ausência da coloração azul). Dessa forma, como este estudo priorizou o isolamento da globulina 11S, devido à sua maior

massa molar, com ausência de amido, a metodologia escolhida para a extração de proteínas foi utilizando a condição experimental 2 (TABELA 4.1) na qual a solubilização foi realizada em solução de NaCl 0,5 M em pH 8 utilizando farinha de quinoa integral.

4.1.2 Diálise do isolado proteico de quinoa

Foi realizada a diálise do isolado proteico de quinoa obtido conforme descrito na FIGURA 3.1 (pág. 48) com o objetivo de eliminar o NaCl utilizado na solubilização da proteína, pois este pode interferir na estabilidade proteica e alterar as suas propriedades funcionais, como a solubilidade e formação de géis. Para a determinação da concentração de sal por meio da condutividade construiu-se uma curva de calibração. A equação 7 mostra a curva de calibração utilizada para a quantificação de NaCl eliminado durante a diálise do IPQ. A curva de calibração foi obtida por meio da medida da condutividade de soluções de NaCl nas concentrações de 3 mg/l a 1 g/l.

$$\text{Condutividade}(\mu S) = 1884 \times \text{Concentração}(g/l) + 10,1 \quad (R^2=0,9987) \quad (7)$$

A FIGURA 4.3 apresenta a curva de remoção de sal durante o processo de diálise do isolado proteico de quinoa. A quantidade de sal aderido no isolado proteico foi em média 1,5 g para cada 100g de sal adicionado na solubilização do isolado proteico.

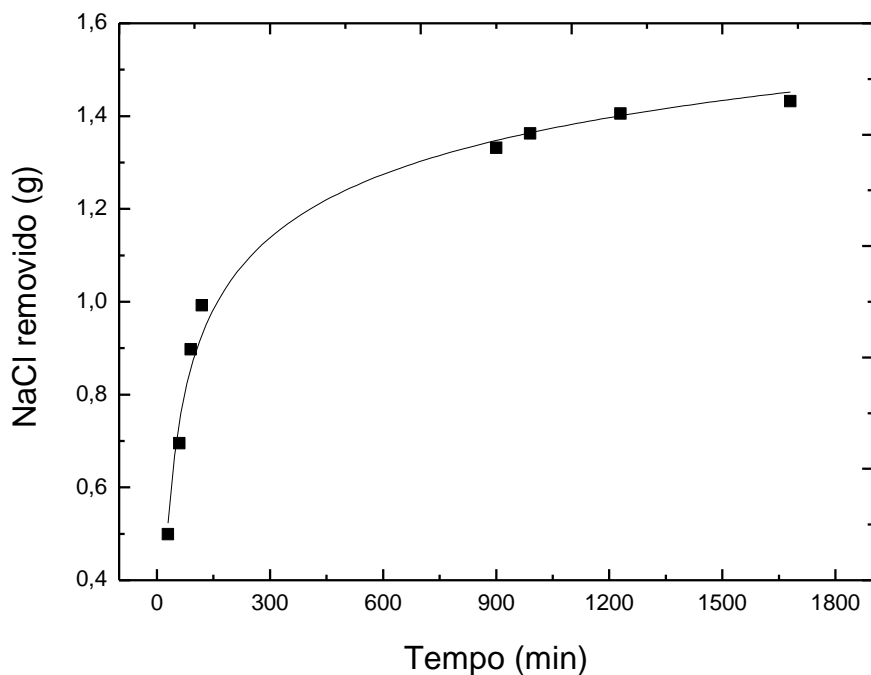


FIGURA 4.3 – AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE NaCl EM FUNÇÃO DO TEMPO DE DIÁLISE POR MEIO DA SUA CONDUTIVIDADE

A remoção de sal presente na solução contendo a proteína de quinoa apresentou uma tendência logarítmica ($R^2=0,9880$). O tempo de diálise necessário para a retirada do sal das amostras foi em média de 30 horas (volume de solução de diálise de ~900ml para ~100ml de solução de proteína com concentração de ~40%), variando de acordo com o volume de amostra e a quantidade de trocas de água. A equação 8 apresenta o ajuste realizado para os dados de remoção de sal da proteína em função do tempo de diálise.

$$\text{Remoção de sal (g)} = 1,19 \times \ln(0,4 \times \ln(\text{tempo (min)})) \quad (8)$$

Drzewiecki *et al.* (2003) utilizaram a diálise por um período de 3 dias para a eliminação de sal presente nas etapas de extração de proteínas de quinoa, amaranto, trigo sarraceno e soja utilizando membrana com corte de 6000 kDa contra água deionizada em temperatura de 4°C. O acompanhamento da remoção de sais da proteína por condutímetro permite a diminuição do tempo

de diálise das amostras garantindo que a quantidade máxima de sal seja removida.

4.2 Caracterização do isolado proteico de quinoa

O estudo das características físico-químicas e a identificação das proteínas presentes no isolado proteico permitem explicar o seu comportamento nas diferentes condições analisadas neste trabalho.

4.2.1 Eletroforese em condições redutoras e não redutoras

O isolado proteico de quinoa foi analisado por eletroforese desnaturante em condições redutoras (sem β - mercaptoetanol) ou não redutoras e não desnaturantes (sem SDS). Como as subunidades ácidas e básicas da globulina 11S de quinoa são unidas por pontes dissulfeto (BRINEGAR e GOUDAN, 1993), é esperado que na eletroforese em condições não redutoras as subunidades migrem juntas, enquanto que na presença do agente redutor β -mercaptoetanol as subunidades deveriam migrar separadamente. As amostras de IPQ foram avaliadas em condições redutoras e não redutoras e os resultados mostrados na FIGURA 4.4 e TABELA 4.2.

A mobilidade eletroforética de uma proteína em gel de SDS-poliacrilamida está relacionada à sua massa molar (NELSON e COX, 2014) Para se estimar a massa molar das proteínas visualizadas no gel, construiu-se uma curva relacionando a migração dos padrões de massa molar no gel (cm) com o logaritmo da massa molar dos padrões (kDa). Os dados experimentais apresentaram uma tendência linear ($R^2=0,98$) representada pela Equação 9.

$$\text{Migração(cm)} = 49,36 - 23,53 \times \log(MM) \quad (9)$$

Por meio da Equação 9 estimou-se a massa molar de todas as bandas presentes no gel conforme apresentado. A TABELA 4.2 mostra as massas

molares estimadas para as bandas visualizadas no gel de eletroforese mostrado na FIGURA 4.4.

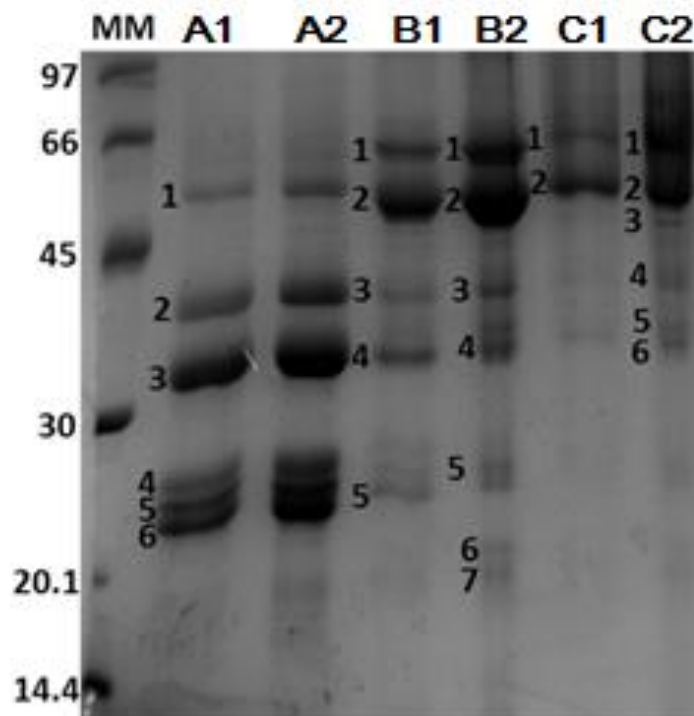


FIGURA 4.4 – ELETROFORESE DO ISOLADO PROTEICO DE QUINOA EM GEL DE TRIS-GLICINA-SDS.

NOTA: MM - contém os padrões de massa molar, com as respectivas massas em kDa; A1 e A2 - condição de análise em tampão de amostra redutor (com β -mercaptoetanol); B1 e B2 - tampão de amostra desnaturante não redutor; C1 e C2 - tampão de amostra não desnaturante, sem SDS e sem β -mercaptoetanol. As bandas foram numeradas para a sua associação ao texto. As duas linhas para cada letra representam o mesmo procedimento de extração do isolado proteico, sendo as colunas A1, B1 e C1 solubilizada em água e as colunas A2, B2 e C2 solubilizada em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,0.

TABELA 4.2 – ESTIMATIVA DA MASSA MOLAR DAS PROTEÍNAS ANALISADAS POR ELETROFORESE EM CONDIÇÕES REDUTORAS E NÃO REDUTORAS

Bandas	A1	A2	B1	B2	C1	C2
1	59,26	59,90	67,10	67,49	70,19	69,16
2	43,11	44,23	56,70	56,98	60,78	59,90
3	35,00	36,05	44,01	44,44		45,77
4	25,47	26,90	36,97	39,83		40,02
5	23,99	24,59	24,47	37,16		37,71
6	22,38	23,28		26,64		
7				24,59		

NOTA: A1, B1 e C1 representam amostras de proteína solubilizadas em água e A2, B2 e C2 solubilizadas em tampão tris-HCl 50 mM pH 8.

A migração das proteínas no gel de eletroforese ocorre se o pH estiver afastado do ponto isoelétrico (NELSOON e COX, 2014). Nas amostras analisadas na condição C (tampão de amostra não desnaturante, sem β -mercaptoetanol e SDS), não é possível observar a presença de bandas de menor massa molar. Isso ocorreu provavelmente, devido à ausência do SDS no tampão de amostra, impossibilitando que as proteínas estivessem suficientemente carregadas para migrar.

Conforme observado na FIGURA 4.4 e TABELA 4.2 (pág. 63), na ausência de β -mercaptoetanol uma banda de cerca de 57 kDa (banda 2 das condições B1 e B2), que não estava presente quando foi usado o tampão com β -mercaptoetanol é visualizada. Esse resultado sugere que a proteína 11S de quinoa apresenta duas subunidades unidas por ponte dissulfeto as quais correm juntas em condições não redutoras.

Manzo (2006) realizou eletroforese em condições redutoras e não redutoras em um isolado proteico de quinoa e encontrou massas molares de 12,9 kDa; 14,5 kDa; 16,0 kDa; 17,1 kDa; 23,3 kDa; 27,6 kDa; 36,9 kDa e 49,7 kDa para a eletroforese sem β -mercaptoetanol. Na presença de β -mercaptoetanol encontrou bandas proteicas de 12,9 kDa; 15,4 kDa; 17,1 kDa e 34,1 kDa. Observa-se que em relação aos estudos realizados pelo autor, foram isoladas proteínas de menor massa molar devido à condição de extração não utilizar solução salina, porém o autor encontra massas molares similares às encontradas neste estudo, em torno de 20 kDa; 30 kDa e 40 kDa que podem se referir as mesmas proteínas encontradas neste trabalho.

Para confirmar a identidade das bandas obtidas pela eletroforese SDS-PAGE, realizou-se espectrometria de massa dessas bandas.

4.2.2 Espectrometria de massas MALDI-ToF

A técnica de MALDI-ToF/MS tem a capacidade de analisar baixas concentrações de peptídeos e proteínas em misturas biológicas complexas. Neste trabalho, realizou-se espectrometria de massas de todas as bandas da coluna A1 ilustrada na FIGURA 4.4 (pág. 63). O espectro de massas obtido foi

comparado com um banco de dados por meio do programa *Mascot*®. A pesquisa resultou na identidade da proteína 11S de quinoa para as bandas 3 e 6. Não foram encontradas identidades similares para as outras bandas analisadas.

A TABELA 4.3 mostra os resultados obtidos por meio da espectrometria de massas, onde é apresentada a cobertura da sequência proteica obtida por meio do programa *Mascot*®.

TABELA 4.3 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE ESPETROMETRIA DE MASSA OBTIDO POR MEIO DO PROGRAMA MASCOT DAS BANDAS RECORTADAS DO GEL DE ELETROFORESE DO IPQ

Amostra	Resultados obtidos pelo software <i>Mascot</i>	Sequência de aminoácidos				
Banda - 3 Coluna - A1	PCS: 33% Ps: 105 MVM: 10 MM teórica: 53,543 kDa Nº acesso: gi 115343513	<u>MAKSTTTLFL</u>	<u>LSCSIALVLL</u>	<u>NGCMGQGRMR</u>	<u>EMQGNECQID</u>	<u>RLTALEPTHR</u>
		<u>IQAEGGLTEV</u>	<u>WDTQDQQFQC</u>	<u>SGVSVIRRTI</u>	<u>EPNGLLLPSF</u>	<u>TSGPELIYIE</u>
		<u>QGNGISGLMI</u>	<u>PGCPETFESM</u>	<u>SQESWREGME</u>	<u>RGMRGGRFQD</u>	<u>QHOKIRHLRQ</u>
		<u>GHIFAMPAGV</u>	<u>AHWAYNSGNE</u>	<u>PLVAVILIDT</u>	<u>SNHANQLDKD</u>	<u>YPKRFYLAGK</u>
		<u>PQQEHSRHHH</u>	<u>RGGESQRGEH</u>	<u>GSDGNVFSGL</u>	<u>DTKSVAQSFG</u>	<u>VSEDIAEKLQ</u>
		<u>AKQDERGNIV</u>	<u>LVQEGHLVIK</u>	<u>PPSSRSYDDE</u>	<u>REQRHRSRPS</u>	<u>NGLEETICSA</u>
		<u>RLSENIDDPs</u>	<u>KADVVSPEAG</u>	<u>RLTTLNSFNL</u>	<u>PILSNLRLSA</u>	<u>EKGVLRYNAI</u>
		<u>MAPHYNLNAH</u>	<u>SIIYGVVRGR</u>	<u>RIQIVNAQGN</u>	<u>SVFDDELROG</u>	<u>QLVVPQNFA</u>
		<u>VVKQAGEEGF</u>	<u>EWIAFKTCEN</u>	<u>ALFQTLAGRT</u>	<u>SAIRAMPVEV</u>	<u>ISNIYQISRE</u>
		<u>QAYRLKFSRS</u>	<u>ETTLFRPENQ</u>	<u>GRQRREMAA</u>		
Banda - 6 Coluna - A1	PCS: 29% Ps: 102 MVM: 11 MM teórica: 53,597 kDa Nº acesso: gi 45510879	<u>MAKSTTTLFL</u>	<u>LSCSIALVLL</u>	<u>NGCMGQGRMR</u>	<u>EMQGNECQID</u>	<u>RLTALEPTYR</u>
		<u>IQAEGGLTEV</u>	<u>WDTQDQQFQC</u>	<u>SGVSVIRRTI</u>	<u>EPNGLLLPSF</u>	<u>TSGPELIYIE</u>
		<u>QGNGISGLMI</u>	<u>PGCPETFESM</u>	<u>SQESWREGME</u>	<u>RGMRGGRFQD</u>	<u>QHOKIRHLRQ</u>
		<u>GHIFAMPAGV</u>	<u>AHWAYNSGNE</u>	<u>PLVAVILIDT</u>	<u>SNHANQLDKD</u>	<u>YPKRFYLAGK</u>
		<u>PQQEHSRHHH</u>	<u>RGGESQRGEH</u>	<u>GSDGNVFSGL</u>	<u>DTKSVAQSFG</u>	<u>VSEDIAEKLQ</u>
		<u>AKQDERGNIV</u>	<u>LVQEGHLVIK</u>	<u>PPSSRSYDDE</u>	<u>REQRHRSRPS</u>	<u>NGLEETICSA</u>
		<u>RLSENIDDPs</u>	<u>KADVVSPEAG</u>	<u>RLTTLNSFNL</u>	<u>PILSNLRLSA</u>	<u>EKGVLRYNAI</u>
		<u>MAPHYNLNAH</u>	<u>SIIYGVVRGR</u>	<u>RIQIVNAQGN</u>	<u>SVFDDELROG</u>	<u>QLVVPQNFA</u>
		<u>VVKQAGEEGF</u>	<u>EWIAFKTCEN</u>	<u>ALFQTLAGRT</u>	<u>SAIRAMPVEV</u>	<u>ISNIYQISRE</u>
		<u>QAYRLKFSRS</u>	<u>ETTLFRPENQ</u>	<u>GRQRREMAA</u>		

NOTA: PSC – cobertura da sequência proteica, MVM – valor de massa combinada e Ps – score proteico.

Na TABELA 4.3 são apresentados o valor de *Ps* (score proteico) que determina se os resultados obtidos são significativos, a massa teórica da proteína encontrada no banco de dados e sua sequência de aminoácidos e o número de acesso registrado no banco de dados. As sequências de aminoácidos sublinhadas representam fragmentos proteicos que possuem massa teórica semelhante às encontradas no espectro experimental das bandas analisadas. Comparando-se as massas teóricas (presentes no banco de dados)

e as experimentais obteve-se o *score* químico das proteínas. Os resultados completos das análises podem ser observados no APÊNDICE 1 (pág. 102).

Segundo Thiede *et al.* (2005) a diferença entre um *score* proteico aleatório e significativo deve ser o mais alto possível, como regra a proteína é identificada com *scores* >100 e a multiplicação entre PCS e MVM deve ser >300. No caso da banda 6, a multiplicação de PCS por MVM, foi de 319 e da banda 3 de 330.

O *score* proteico encontrado para a banda 3 (FIGURA 4.4 - A1) foi de 105, esse *score* é considerado significativo ($p < 0,05$), confirmando a identidade da proteína analisada como sendo a globulina 11S proveniente dos grãos de quinoa com massa teórica de 53,54 kDa. Para a banda 6 (FIGURA 4.4 - A1), o *score* proteico encontrado foi de 102, confirmando novamente a identidade da proteína como a globulina 11S da quinoa.

Dessa forma pode-se afirmar que essas bandas correspondem a globulina 11S e associando os dados de MALDI-ToF/MS aos dados da eletroforese em condições redutoras e não redutoras concluiu-se que cada banda corresponde a uma subunidade dessa proteína.

4.2.3 Caracterização físico-química

A farinha de quinoa com granulometria $\leq 177 \mu\text{m}$ apresentou conteúdo de proteínas de $19,9 \pm 0,1\%$, determinado pelo método de Kjeldahl, esse resultado concorda com os obtidos por Borges *et al.* (2003) com um teor de 17,4% e Palombini *et al.* (2013) com 16,4%, que estudaram a composição nutricional de proteínas de quinoa da variedade BRS Piabiru. Estes autores estudaram as características nutricionais dos grãos de quinoa e avaliaram a composição físico-química do grão integral. Neste estudo, estudou-se a composição físico-química da farinha de quinoa com granulometria $\leq 177 \mu\text{m}$, pois somente esta fração foi utilizada para a extração de proteínas.

O rendimento obtido na condição de extração escolhida foi de 3,71 g de isolado proteico para 100 g de farinha de quinoa. Este menor rendimento em relação à TABELA 4.1, que mostra o rendimento de proteína no extrato bruto para as diferentes metodologias de isolamento de proteínas, ocorreu

principalmente a perdas durante etapa de diálise e liofilização. O teor de proteínas no IPQ foi de $88,5 \pm 0,3\%$ e do resíduo sólido resultante da solubilização em pH 8 e solução de NaCl foi de $10,1 \pm 0,4\%$ de proteínas, possivelmente composto pela albumina 2S.

O conteúdo de umidade e cinzas do isolado proteico de quinoa foi determinado por meio de Termogravimetria (TG). A FIGURA 4.5 apresenta a curva de TG (perda de massa em função da temperatura) e DTG (perda de massa em função do tempo de análise para cada temperatura) obtida para o IPQ.

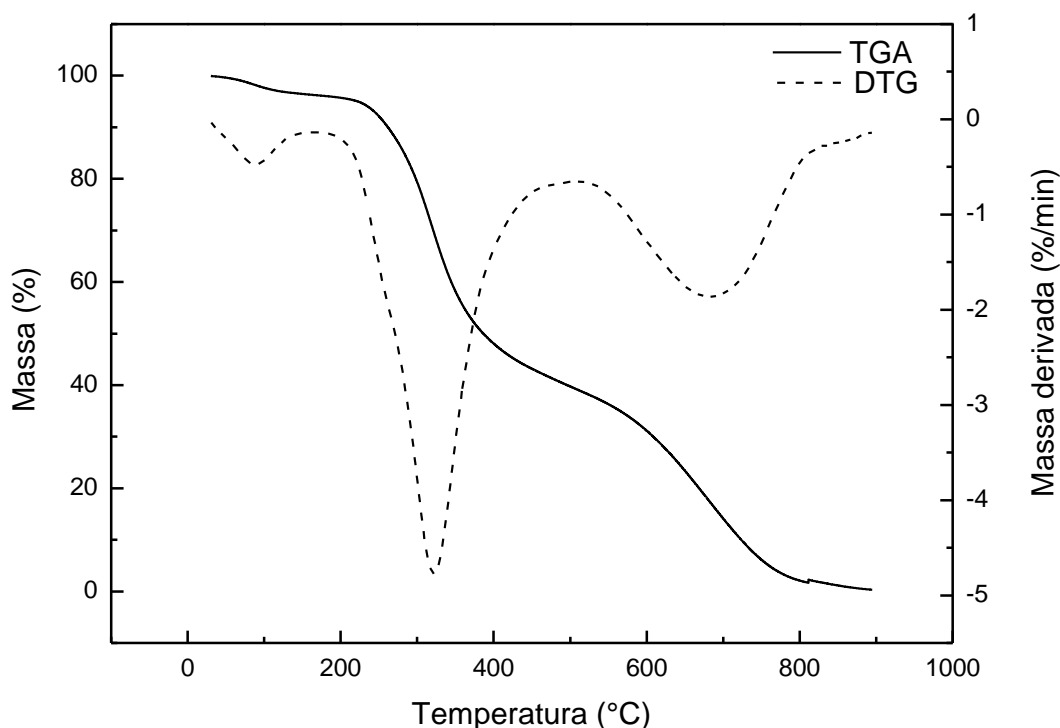


FIGURA 4.5 – CURVA DE TG E DTG PARA O ISOLADO PROTEICO DE QUINOA LIOFILIZADO.

NOTA: aquecimento em atmosfera de ar sintético com fluxo de calor de 20 ml/min.

A curva de DTG apresentou três picos de perda de massa. O primeiro na faixa de 30-170°C, o segundo na faixa de 200-500°C e o terceiro na faixa de 520-800°C. O primeiro pico foi correspondente à evaporação da água (temperatura

de pico de 92,4°C), onde a perda de massa foi de 3,43%. A umidade do isolado proteico foi baixa quando comparado a outros estudos com isolados proteicos de quinoa (MANZO, 2006; ALUKO e MONU, 2003), o que garante a estabilidade microbiológica e conformacional desse isolado proteico durante o armazenamento (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

A maior queda de massa observada teve início na temperatura de 200°C e terminou em 470°C (temperatura de pico de 324,9°C) esse pico provavelmente é devido a degradação proteica. Os resultados apresentam a mesma tendência de Kebelmann *et al.* (2013) que estudaram proteínas obtidas a partir de microalgas e encontraram a maior perda de massa na faixa de 200°C a 500°C. Quanto ao terceiro pico, não foram encontrados na literatura resultados similares de perda de massa para proteínas nessa faixa de temperatura. Devido ao conteúdo de proteínas determinado por Kjeldahl no IPQ ser de 88,5% e a soma do segundo e do terceiro pico representar cerca de 70% da perda de massa, o terceiro pico pode indicar também degradação proteica.

O material inorgânico ao final da análise foi de 2,1% que corresponde ao teor de cinzas do isolado proteico. Este resultado condiz com o teor de cinzas encontrado por Luvielmo e Antunes (2002) em isolados proteicos de soro de leite, que foi de 2,5% porém foi menor do que o teor de cinzas encontrado por Barrio e Añón (2010) para isolados proteicos de amaranto com teor de 3,4% e de Abugoch *et al* (2008) que obteve um teor de 3% para um isolado proteico de quinoa.

A TABELA 4.4 mostra os resultados das análises físico-químicas realizadas no isolado proteico de quinoa liofilizado.

TABELA 4.4 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO ISOLADO PROTEICO DE QUINOA

Componente determinado	Metodologia	Porcentagem
Umidade	TG ¹	3,4±0,5
Cinzas	TG ¹	2,1±0,1
Carboidrato	Fenol-ácido sulfúrico ²	1,5±0,1
Proteína	Kjeldahl ³	88,5±0,3

¹ Termogravimetria com aquecimento de 30°C a 900°C; ² Dubois *et al.*, (1956); ³ AOAC (2005).

A quantidade de proteína presente no IPQ foi de 88,5%, mostrando que houve pouca contaminação durante a extração devido principalmente à etapa de diálise que pode ter eliminado contaminantes de baixa massa molar como carboidratos.

A soma de todos os componentes determinados neste estudo resultou em 95,53%. O restante da massa pode ser de lipídeos, pois a farinha não foi deslipidificada durante as etapas de extração. Outro fator que também pode ter influenciado nessa diferença pode ser devido ao erro na determinação de proteínas pelo método de Kjeldahl, onde foi utilizado um fator de 5,85, porém os fatores de correção podem variar de acordo com a composição de aminoácidos da proteína.

4.2.4 Determinação da solubilidade do isolado proteico

A solubilidade tem influência significativa em todas as propriedades funcionais de proteínas como a geleificação, formação de espumas, retenção de água e capacidade emulsificante (POPOVIĆ *et al.*, 2013). Dessa forma, a determinação da solubilidade foi essencial para a correlação com a capacidade geleificante do IPQ e melhor conhecimento das características das proteínas de quinoa importantes na determinação de sua aplicação.

A FIGURA 4.6 mostra a solubilidade do isolado proteico de quinoa em diferentes valores de pH em meio com força iônica de 0,3.

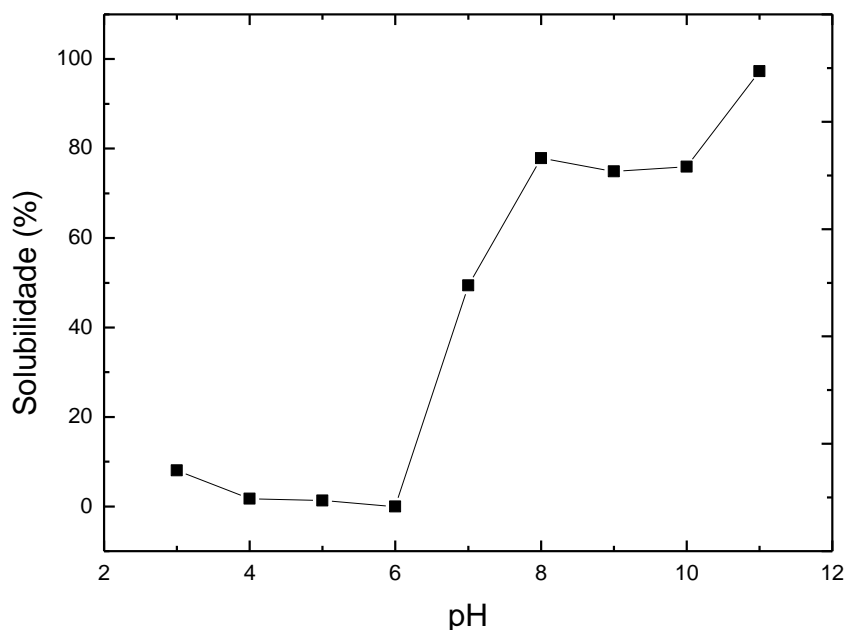


FIGURA 4.6 – SOLUBILIDADE DO ISOLADO PROTEICO DE QUINOA EM FUNÇÃO DO pH EM FORÇA IÔNICA DE 0,3.

Nota: Dispersões de proteína a 1% em tampão 0,1 M com valores de pH variando de 3 a 11 (tampão fosfato do pH 2 ao 7, tampão Tris-HCl para o pH 8, tampão borato para o pH 9 e tampão bicarbonato de sódio para os pHs 10 e 11) e força iônica de 0,3 (ajustada com NaCl).

Observa-se que em pH ácido as proteínas presentes no isolado proteico de quinoa ficam praticamente insolúveis. O ponto isoelétrico da proteína 11S de quinoa se encontra é de cerca de 5 (observado por Brinegar & Goudan (1993) que obteve maior rendimento dessa proteína neste pH), dessa forma, é compreensível que em valores próximos a esse pH a proteína fique pouco solúvel pois não existem cargas repulsivas na proteína e ela se associa e precipita.

Em pH básico (acima de 8) a solubilidade do IPQ aumentou até um valor próximo a 100%, esse fato é atribuído a presença de cargas negativas nas proteínas, que garantem a manutenção das pontes de hidrogênio (H) e o esticamento da cadeia polipeptídica. Além disso, quando o pH está muito acima do ponto isoelétrico, o número de grupos com cargas negativas (sulfidril da cisteína e fenólico da tirosina), fazendo com que a proteína funcione como receptora de H, ao passo que a hidroxila (OH^-) continua sendo receptora e doadora de H (FARFÁN, 1990).

Abugoch *et al.* (2008) estudou dois métodos de extração de proteína de quinoa, um em pH 9 e outro em pH 11, e encontrou resultados de solubilidade semelhantes onde altas solubilidades foram obtidas em pHs maiores que 5, alcançando valores próximos a 100%, e baixa solubilidade em pH 3 e 4 (~10%). Porém Manzo (2006) obteve uma solubilidade menor para o isolado proteico, sendo que a maior solubilidade foi de 40% para o pH 11.

Em relação a geleificação de proteínas, quando existe um pequeno grau de interação entre as moléculas de proteínas e as moléculas de água, agregados ou precipitados são obtidos ao invés de géis proteicos.

4.3 Efeito do pH, temperatura e concentração no comportamento geleificante do isolado proteico de quinoa

A condição inicial necessária para que ocorra a geleificação é a desnaturação proteica para que os grupos funcionais da proteína fiquem expostos (CASTRO, 2000; FOEGEDING, 2006; TOTOSAUS *et al.*, 2002). Nesse estudo a desnaturação proteica foi determinada por meio de DSC e os dados correlacionados com os resultados obtidos por meio de reologia oscilatória.

Sabe-se que os principais fatores que afetam a geleificação de proteínas são o pH, a força iônica da solução e a concentração proteica. Quando a força iônica do meio aumenta as forças repulsivas das proteínas diminuem. E quando o pH está elevado as forças repulsivas são acentuadas devido ao aumento das cargas positivas nas proteínas. Conforme já apresentado, a globulina 11S de quinoa possui ponto isoelétrico próximo a 5, dessa forma nesse estudo, escolheu-se avaliar a capacidade geleificante do IPQ nos pHs 3,5, onde existe a presença de cargas positivas, e no pH 7,0, presença de cargas negativas.

Também avaliou-se a influência da adição dos sais $MgCl_2$ e $CaCl_2$ na capacidade geleificante do IPQ, esses sais foram escolhidos pois as moléculas divalentes auxiliam na formação da rede de gel devido a formação de ponte iônica entre 2 grupos carboxílicos adjacentes de diferentes cadeias peptídicas (ANDRADE e NASSER, 2005).

4.3.1 Desnaturação proteica

A condição inicial necessária para que ocorra a geleificação é a desnaturação proteica para que os grupos reativos da proteína fiquem expostos (TOTOSAUS *et al.*, 2002). A nível molecular, o modelo de desnaturação/agregação pode ser usado para explicar como diferentes tipos de rede de géis são formadas (FOEGEDING, 2006). Neste trabalho a determinação da temperatura de desnaturação do isolado proteico de quinoa foi determinada por meio de calorimetria exploratória diferencial (DSC). A temperatura e entalpia de desnaturação do último pico observado por meio do DSC para as diferentes condições estudadas estão apresentados na TABELA 4.5.

TABELA 4.5 – TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO (T_D) DO ISOLADO PROTEICO DE QUINOA NOS pHs 3,5 E 7,0, COM E SEM ADIÇÃO DOS ÍONS CÁLCIO E MAGNÉSIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 10% OU 15%.

Amostra nº	pH	IPQ (m/m) %	Sal (55mmol/g)	T_D (°C)	ΔH (J/g)
1	3,5	10	-	85,9	24,0
2	3,5	10	CaCl ₂	82,5	90,2
3	3,5	10	MgCl ₂	85,7	17,8
4	3,5	15	-	88,7	30,7
5	3,5	15	CaCl ₂	88,9	143,4
6	3,5	15	MgCl ₂	80,5	69,8
7	7,0	10	-	83,4	75,4
8	7,0	10	CaCl ₂	-	-
9	7,0	10	MgCl ₂	82,9	34,5
10	7,0	15	-	76,7	164,1
11	7,0	15	CaCl ₂	85,1	20,0
12	7,0	15	MgCl ₂	-	-

NOTA: Atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 ml/min. A amostra (~7mg) foi aquecida em panelinha padrão de alumínio aberta de 5°C a 90°C a uma taxa de 2°C/min.

A TABELA 4.5 apresenta as temperaturas de desnaturação das amostras foram próximas a 80°C, com exceção das amostras 8 e 12 que não apresentaram nenhum evento térmico. Conforme relatado anteriormente, Abugoch *et al.* (2008) encontrou uma temperatura de desnaturação de 98.1 °C

para um isolado proteico de quinoa extraído em pH 9. Essa maior estabilidade pode ter sido causada devido as diferentes condições de análise e extração de proteínas.

A maior temperatura de desnaturação observada foi de 88,9°C para a amostra 5 (pH 3,5; 15% de IPQ; Ca^{2+}), que também apresentou a maior entalpia de desnaturação (143,4 J/G). A temperatura de desnaturação de 89°C obtida por DSC. Este resultado foi usado como referência para a escolha da temperatura de limite máximo de temperatura nas análises reológicas de varredura de temperatura.

Nas soluções proteicas em pH 3,5 sem adição de sais (amostras 1 e 4) e com a adição de Ca^{2+} (amostras 2 e 5), com o aumento da concentração proteica houve o deslocamento do pico para uma temperatura maior e a entalpia de desnaturação também aumentou, ou seja, mais energia é necessária para desnaturar uma maior quantidade de proteína nessas condições. Já para as soluções com a adição de Mg^{2+} (amostras 3 e 6) o efeito foi contrário, ou seja, para concentrações menores de proteína a temperatura de desnaturação foi maior.

As amostras 4 e 7 apresentaram mais de um pico, conforme pode-se observar no APÊNDICE 2, mostrando que nestas amostras existe a presença de mais de uma proteína a ser desnaturada.

Não foram obtidos eventos térmicos nas amostras 8 (pH 7,0, 10% de IPQ, Ca^{2+}) e 12 (pH 7,0, 15% de IPQ, Mg^{2+}), ou seja, o Mg^{2+} e o Ca^{2+} podem ter protegido a amostra nessas condições e, devido a limitação da técnica utilizada neste trabalho, onde a amostra foi analisada até 90°C, não foi possível observar eventos térmicos acima dessa temperatura. Segundo Sobral, Palazolo e Wagner (2011), a presença de cátions divalentes como o cálcio e magnésio associados com uma baixa atividade de água aumenta a estabilidade térmica das proteínas alimentares.

A desnaturação ocorre em temperaturas mais altas para o pH 3,5 quando comparado ao pH 7 em todas as amostras. Nesse estudo, o IPQ apresentou uma baixa solubilidade em pH ácido. Isso mostra que existe uma maior interação molecular entre as cadeias polipeptídicas ocasionado a maior estabilidade no pH 3,5.

4.3.2 Capacidade geleificante em pH 3,5

A capacidade geleificante do isolado proteico de quinoa foi avaliada por meio de reologia oscilatória e os valores de G' e G'' foram obtidos para as diferentes temperaturas. A FIGURA 4.7 apresenta os resultados obtidos de G' e G'' em função da varredura de temperatura (aquecimento de 20°C até 90°C e resfriamento de 90°C até 20°C) para as amostras de isolado proteico de quinoa nas concentrações de 10% e 15% solubilizadas em água e pH 3,5.

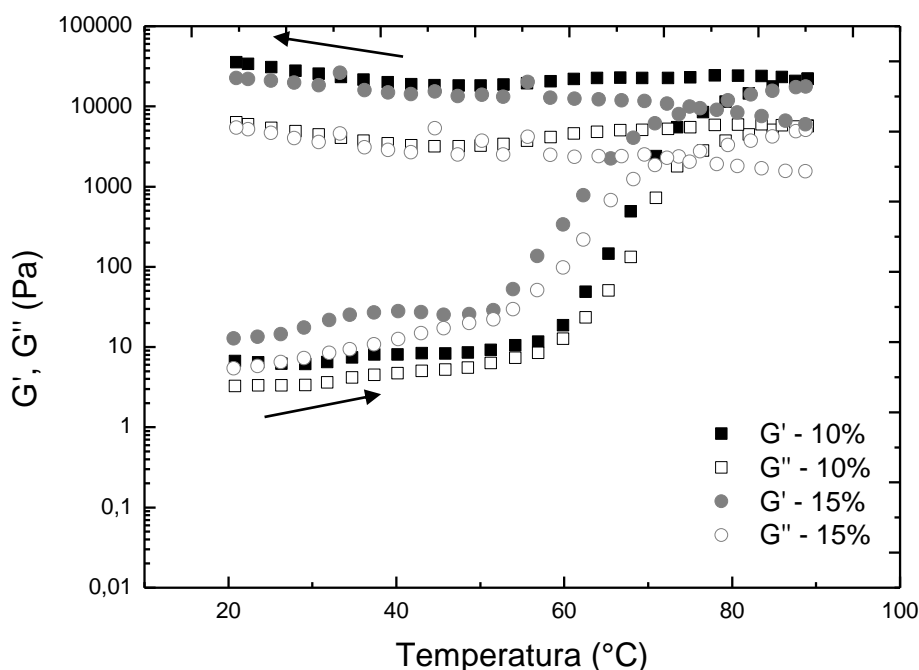


FIGURA 4.7 - VARIAÇÃO DO G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO, PARA SOLUÇÕES DE IPQ EM pH 3,5.

NOTA: Frequência de 1 Hz e deformação de 1%. Aquecimento de 20°C a 90°C a uma taxa de 2°C/min, em seguida, resfriamento até 20°C a uma taxa de 2°C/min.

Em todas as amostras avaliadas neste trabalho, os valores de G' foram maiores que G'' durante varredura de temperatura. Sabe-se que para o estado fluido G'' normalmente será maior que G' , porém, segundo relatado por Gosal e Ross-Murphy (2000), em soluções proteicas isso não é sempre observado. Durante o aquecimento, existe um tempo *lag* inicial. Em seguida G'' e G' começam a aumentar, devido a concentração da proteína ser maior que a crítica.

Andrade e Nasser (2005) estudaram a geleificação das proteínas do soro do leite e obtiveram resultados onde com o aumento da temperatura o módulo viscoso aumentou e este se tornou praticamente linear na faixa de 70°C - 90°C conforme foi observado neste estudo. Bejarano-Luján, Cunha e Netto (2010) encontraram resultados semelhantes para isolados proteicos de amaranto (*Amaranthus cruentus*) na concentração de 12% sem ajuste de pH. O ponto de gel foi considerado pelos autores como a temperatura onde houve um aumento abrupto nos valores de G' durante o aquecimento, encontrando temperaturas de formação de gel entre 59,5°C e 81°C.

A FIGURA 4.8 mostra os resultados da reologia para as amostras de isolado proteico de quinoa nas concentrações de 10% e 15% solubilizadas em pH 3,5 com adição de cloreto de cálcio.

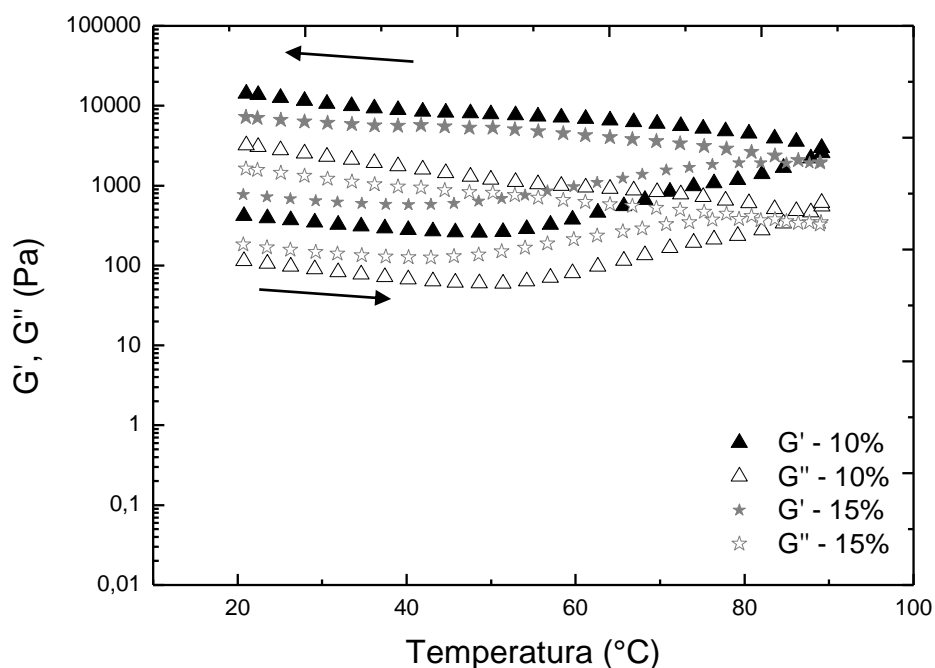


FIGURA 4.8 - VARIAÇÃO DO G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO, PARA SOLUÇÕES DE IPQ NO pH 3,5 COM ADIÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO.

NOTA: Frequência de 1 Hz e deformação de 1%. Aquecimento de 20 °C a 90 °C a uma taxa de 2°C/min, em seguida, resfriamento até 20°C a uma taxa de 2°C/min.

A adição do íon divalente Ca^{2+} nas soluções proteicas em pH 3,5 ocasionou o valor de G' inicial maior (acima de 400 Pa a 20°C) do que as amostras sem adição desse íon (menor que 15 Pa) em ambas as concentrações de IPQ estudadas. Porém ao final do aquecimento (90°C), os valores de G' da amostra solubilizada em água foram maiores (~20.000 Pa) em relação aquelas com adição de Ca^{2+} (~10.000 Pa).

As amostras com adição de Ca^{2+} foram menos influenciadas pelas variações de temperatura nas análises reológicas, mostrando um comportamento de gel mais estável logo no início do experimento com uma rede proteica bem definida que não sofreu grandes interferências devido ao aquecimento. Esse comportamento foi confirmado por meio da entalpia de desnaturação obtida pelo DSC, onde uma quantidade de calor maior foi necessária para a desnaturação proteica (90,2 J/g e 143,4 J/g para as concentrações de 10% e 15% de IPQ respectivamente).

Algumas proteínas tem a propriedade de formar géis a frio devido à diminuição do pH que é normalmente seguida da adição de sais como cloreto de cálcio. Esta capacidade vem sendo estudada principalmente em proteínas do soro de leite (KUHN, CAVALLIERI e CUNHA, 2010; ALTING *et al.*, 2002; BRYANT e MCCLEMENTS, 1998). Neste estudo, os valores iniciais de G' e G'' das amostras em pH 3,5 com adição de CaCl_2 sugerem a formação de géis a frio. Segundo Phan-Xuan *et al.* (2014), a agregação proteica induzida pela adição de cloreto de cálcio ocorre devido principalmente às ligações intermoleculares entre cadeias negativas ou grupos carboxílicos das proteínas, à redução das cargas negativas das proteínas e/ou mudanças na conformação alterando as interações hidrofóbicas.

A FIGURA 4.9 (pág. 77) mostra resultados da reologia para as amostras de isolado proteico de quinoa nas concentrações de 10% e 15% solubilizadas em pH 3,5 com adição de cloreto de magnésio. Pode-se observar que nestas amostras a adição dos íons Mg^{2+} proporcionou valores de G' e G'' iniciais maiores do que as amostras sem adição de sais. Porém, as amostras com adição de Ca^{2+} formaram géis ligeiramente mais fortes. Luviélmo e Antunes (2002) que estudaram a influência dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} na geleificação de proteínas do soro de leite, obtiveram resultados semelhantes e apontam que o

cálcio tem maior afinidade com cadeias peptídicas e assim é mais favorável à formação de gel.

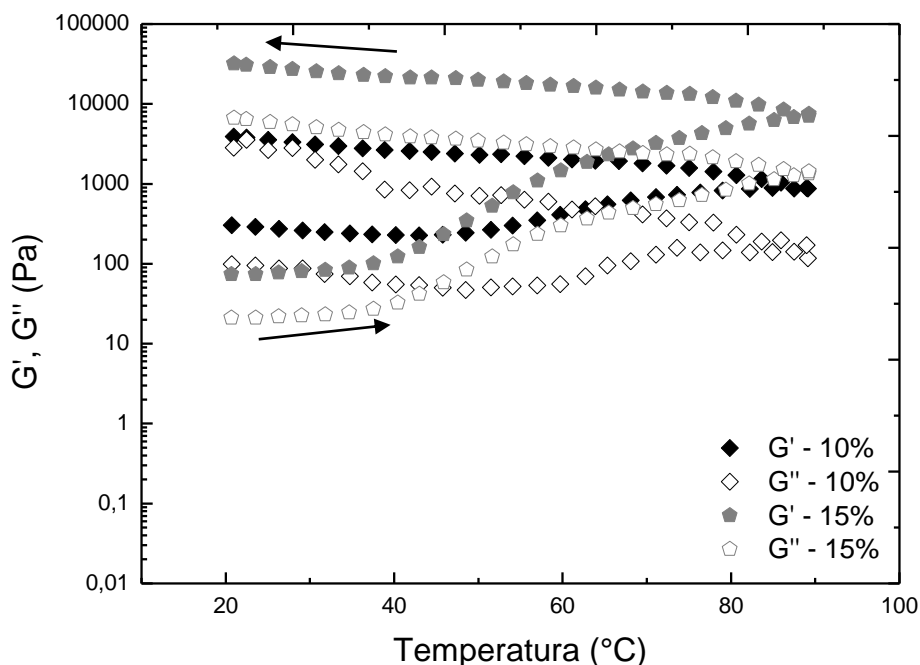


FIGURA 4.9 - VARIAÇÃO DO G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO, PARA SOLUÇÕES DE IPQ NO pH 3,5 COM ADIÇÃO DE CLORETO DE MAGNÉSIO.

NOTA: Frequência de 1 Hz e deformação de 1%. Aquecimento de 20 °C a 90 °C a uma taxa de 2°C/min, em seguida, resfriamento até 20°C a uma taxa de 2°C/min.

A TABELA 4.6 mostra os valores de G' iniciais, após aquecimento a 90°C e após resfriamento até 20°C e as temperaturas de geleificação das diferentes amostras de proteína de quinoa no pH 3,5. Em relação ao ajuste dos dados à equação de Boltzmann, as amostras analisadas em sistema oscilatório dinâmico apresentaram um ajuste satisfatório ($R^2 \geq 0,99$) conforme pode ser visualizado no APÊNDICE 4 (pág. 110).

TABELA 4.6 – VALORES DE G' INICIAIS, APÓS AQUECIMENTO A 90°C E APÓS RESFRIAMENTO ATÉ 20°C

Amostra nº	% IPQ (m/m)	Íon	G'_i (Pa)	G'_{aq} (Pa)	G'_f (Pa)	T_G (°C)
1	10	-	7	22.738	36.332	82,5bc
2	10	Ca ²⁺	419	2.968	14.246	na ¹
3	10	Mg ²⁺	305	880	3.979	64,6
4	15	-	13	18.318	22.651	75,5
5	15	Ca ²⁺	772	1.922	7.340	65,3
6	15	Mg ²⁺	74	7.260	32.645	77,5

NOTA: G'_i – módulo elástico no início do experimento a 20°C; G'_{aq} - módulo elástico após aquecimento até 90°C; G'_f - módulo elástico no final do experimento a 20°C ; T_G – temperatura de geleificação. na¹ – sem convergência.

Durante o resfriamento G' aumentou para todas as amostras. Esse comportamento pode ser atribuído ao rearranjo da estrutura de rede e maior interação entre as proteínas e o solvente utilizado. Ramos *et al.* (2012) encontrou resultados semelhantes para proteínas do soro de leite e atribuiu esse resultado à diminuição da mobilidade das moléculas, que permite a formação de ligação mais fortes entre as cadeias das proteínas.

A concentração não ocasionou grandes mudanças nas temperaturas de geleificação das amostras de IPQ no pH 3,5. Por exemplo, a amostra de IPQ solubilizada em água no pH 3,5 com concentração de 10% (amostra 1) apresentou temperatura de geleificação de 82,5°C e na concentração de 15% de 75,5°C conforme pode ser verificado na TABELA 4.6.

Por meio das FIGURAS 4.7, 4.8 e 4.9 (amostras preparadas em pH 3,5), pode-se notar que as curvas apresentam a mesma tendência de crescimento de G' e G'' o que proporciona temperaturas de transição similares, apesar de os valores numéricos de G' e G'' apresentam variação entre si. Porém, pode-se observar que as amostras que apresentaram menor temperatura de geleificação foram as amostras 3 (10% de IPQ, Mg²⁺) e a amostra 5 (15% de IPQ, Ca²⁺) com temperaturas de geleificação de 64,6°C e 65,3°C. Segundo Ramos *et al.* (2012) que estudaram a geleificação de proteínas do soro do leite em diferentes pHs, uma menor temperatura de geleificação está relacionada à maior afinidade entre

as cadeias da proteína. E, segundo Farfán (1990), um aumento moderado da força iônica do meio estimula indiretamente as interações hidrofóbicas intermoleculares. O que, associado ao pH ácido, pode ter ocasionado a menor temperatura de geleificação do IPQ nestas condições.

Como neste estudo todas as amostras de pH 3,5 apresentaram um aumento nos valores de G' e G'' durante o aquecimento e resfriamento, concluiu-se que os géis formados nessa condição são estáveis a temperatura, ou seja, não são termorreversíveis. Esta é uma característica dos géis tipo coágulo observados principalmente em proteínas de soja e que apresentam coloração opaca como foi observado neste estudo.

Para Renkema *et al.* (2000), que estudou a geleificação de proteínas de soja, a aparência dos géis proteicos podem indicar o tipo de rede formada. Géis brancos indicam que estes consistem em partículas de 1mm ou maiores. Visualmente os géis formados no pH 3,5 foram opacos e com coloração branca, como pode ser observado no APÊNDICE 3 (pág. 106). A mesma aparência nos diferentes pHs foi observada por Lakemond *et al.* (2003), para a globulina 11S de soja, onde em pH 3,8 o gel formado foi branco e em pH 7,6 o gel era amarelado para força iônica de 0,2. Segundo Damodaran, Parkin e Fennema (2010) géis do tipo coágulo (opacos) são formados por redes com regiões de alta concentração polimérica separadas por regiões quase desprovidas de polímero.

Urbonaite *et al.* (2014) observaram que proteínas de soja em concentrações de $MgCl_2$ maiores que 0,1 mM uma dependência proporcional da turbidez com o aumento da adição de sal sugerindo um maior número de agregados. Neste trabalho essa tendência foi melhor visualizada antes do aquecimento da amostra, onde quando não foi adicionado sais ao meio as amostras apresentaram visualmente coloração mais clara.

4.3.3 Capacidade geleificante em pH 7,0

Os resultados da reologia oscilatória para as amostras preparadas em pH 7,0 nas concentrações de 10% e 15% de isolado proteico de quinoa solubilizadas em água estão apresentadas na FIGURA 4.10.

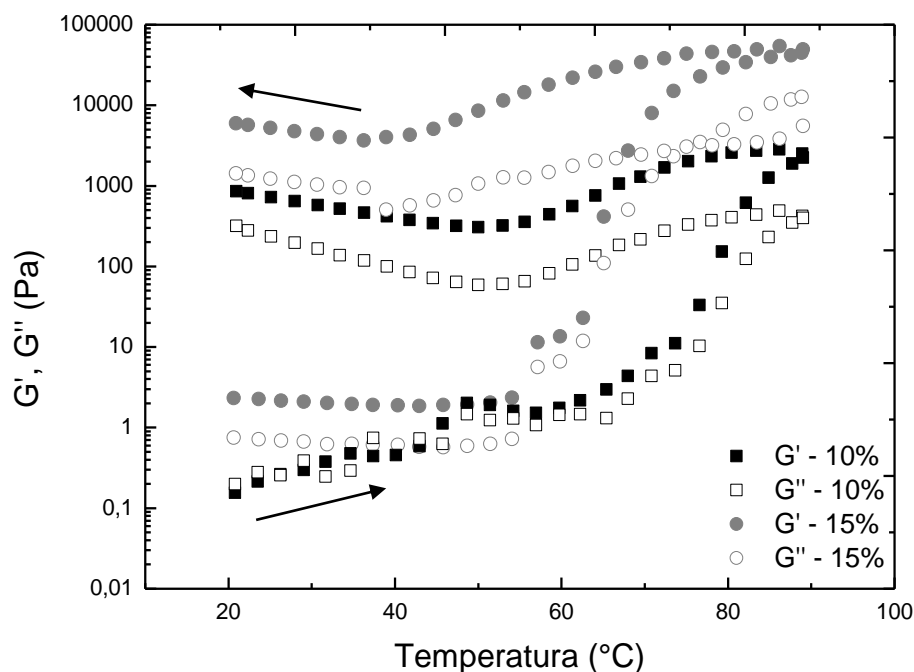


FIGURA 4.10 - VARIAÇÃO DO G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO, PARA SOLUÇÕES DE IPQ NO pH 7,0. NOTA: Frequência de 1 Hz e deformação de 1%. Aquecimento de 20 °C a 90 °C a uma taxa de 2°C/min, em seguida, resfriamento até 20°C a uma taxa de 2°C/min.

Os valores de G' e G'' foram baixos no início do experimento (próximo a zero na concentração de 10% de IPQ). Segundo Renkema, Gruppen e Van Vliet (2002), os valores baixos de G' são encontrados em pHs elevados devido à alta quantidade de proteína dissolvida nessas condições. É esperado que a proteína que permanece dissolvida depois do aquecimento não seja incorporada na rede, ao contrário de polipeptídios e subunidades precipitadas.

A FIGURA 4.11 mostra resultados da reologia para as amostras de isolado proteico de quinoa nas concentrações de 10% e 15% solubilizadas em pH 7,0 com adição de cloreto de cálcio. Onde a adição do íon divalente Ca^{2+} nas soluções proteicas em pH 7,0 proporcionaram valores de G' inicial maiores no início do experimento (176 Pa a 20°C) do que as amostras sem adição desse íon (2 Pa a 20°C) nas concentrações de IPQ de 15%. Porém ao final do aquecimento (90°C), os valores de G' da amostra solubilizada em água foram

maiores (~45.510 Pa) em relação aquelas com adição de Ca^{2+} (~21.496 Pa) nas mesmas condições.

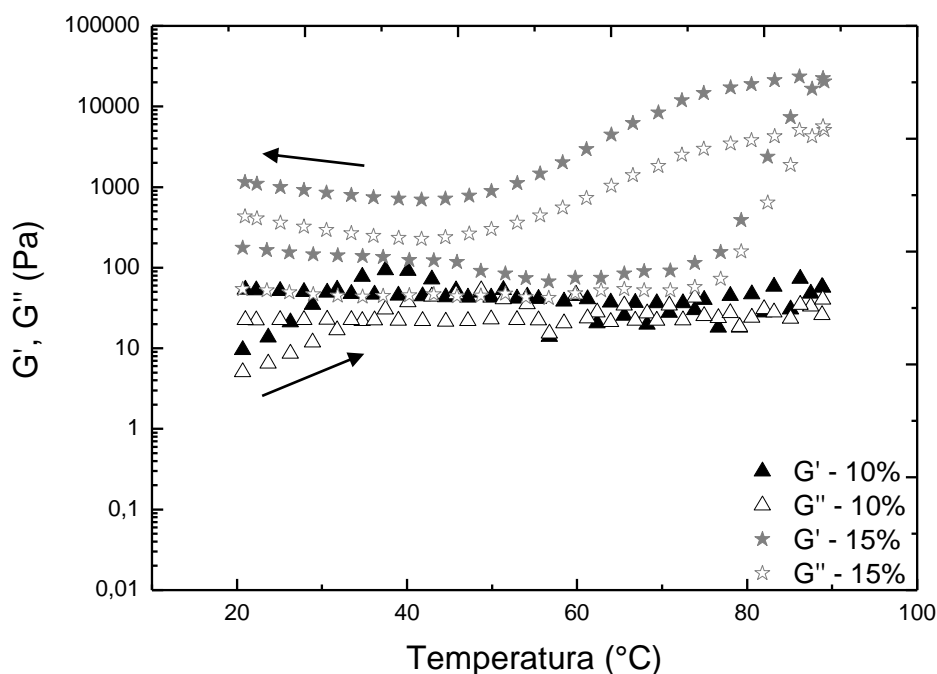


FIGURA 4.11 - VARIAÇÃO DO G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO, PARA SOLUÇÕES DE IPQ NO pH 7 COM ADIÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO.

NOTA: Frequência de 1 Hz e deformação de 1%. Aquecimento de 20 °C a 90 °C a uma taxa de 2°C/min, em seguida, resfriamento até 20°C a uma taxa de 2°C/min.

Pode-se observar que as variações de temperatura na amostra 8 (10% de IPQ com adição de Ca^{2+}) não alteraram os valores de G' e G'' , mostrando um comportamento de solução concentrada durante todo o experimento. Essa amostra também não apresentou evento térmico no DSC, isso pode ter ocorrido devido à alta estabilidade térmica do IPQ nessas condições onde variações de temperatura não causam perturbações na amostra.

A FIGURA 4.12 mostra resultados da reologia para as amostras de isolado proteico de quinoa nas concentrações de 10% e 15% solubilizadas em pH 3,5 com adição de cloreto de magnésio.

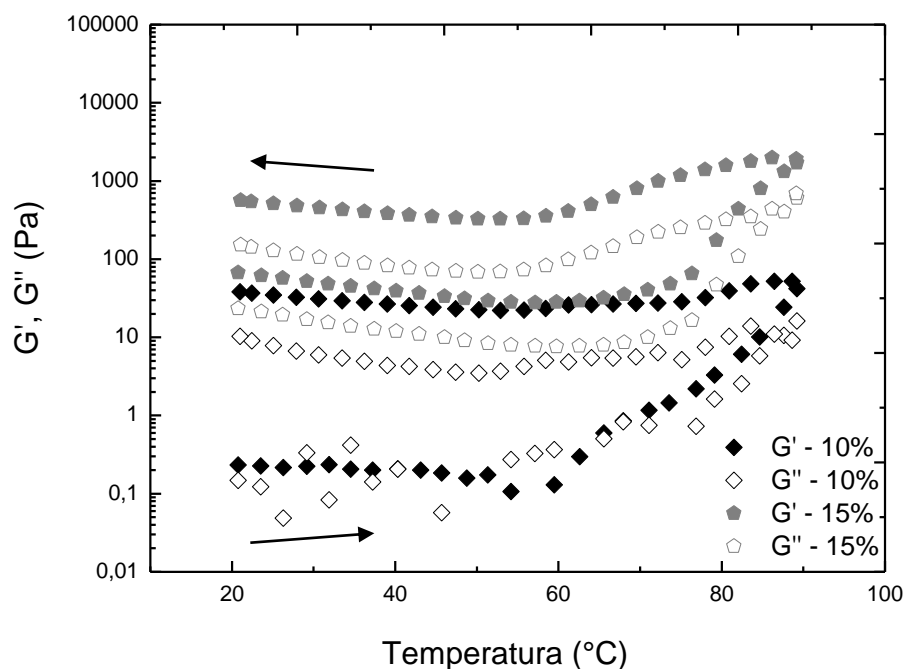


FIGURA 4.12 - VARIAÇÃO DO G' E G'' EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO, PARA SOLUÇÕES DE IPQ NO pH 7 COM ADIÇÃO DE CLORETO DE MAGNÉSIO.

NOTA: Frequência de 1 Hz e deformação de 1%. Aquecimento de 20 °C a 90 °C a uma taxa de 2°C/min, em seguida, resfriamento até 20°C a uma taxa de 2°C/min.

Os sais de Ca^{2+} e Mg^{2+} não ajudam na formação de rede de gel em pH 7,0 na concentração de 10% de IPQ, causando valores de G' e G'' relativamente baixos ao final do experimento quando comparados com as amostras sem adição desses sais. Segundo Foegeding (2006), os géis formados em pH 7,0 geralmente são particulados, e precipitados são obtidos quando a concentração proteica está acima da crítica. Neste estudo, com a adição de íons divalentes, soluções pouco viscosas foram formadas. Esse efeito pode ser atribuído à exposição de grupos com menor afinidade pelos íons de cálcio e magnésio quando a solução proteica encontra-se em pH 7,0.

A TABELA 4.7 mostra os valores de G' iniciais, após aquecimento a 90°C e após resfriamento até 20°C e as temperaturas de geleificação das diferentes amostras de proteína de quinoa no pH 7,0. As amostras analisadas tiveram ajuste satisfatório à equação de Boltzmann ($R^2 \geq 0,99$), com exceção somente da amostra 8 (pH 7, 10% de IPQ, e adição de Ca^{2+}), conforme pode ser

visualizado no APÊNDICE 4 (pág. 110) não houve diferença significativa entre as temperaturas de geleificação das amostras de IPQ preparadas neste pH.

TABELA 4.7 – VALORES DE G' INICIAIS, APÓS AQUECIMENTO A 90°C E APÓS RESFRIAMENTO ATÉ 20°C

Amostra nº	% IPQ (m/m)	Íon	G'_i (Pa)	G'_{aq} (Pa)	G'_f (Pa)	T_G (°C)
7	10	-	0	2.446	882	87,4
8	10	Ca ²⁺	10	76	54	na ²
9	10	Mg ²⁺	0	48	38	na ¹
10	15	-	2	45.510	6.108	77,8
11	15	Ca ²⁺	176	21.496	1.170	86,4
12	15	Mg ²⁺	68	1.845	575	87,1

NOTA: G'_i – módulo elástico no início do experimento a 20°C; G'_{aq} - módulo elástico após aquecimento até 90°C; G'_f - módulo elástico no final do experimento a 20°C ; T_G – temperatura de geleificação. na¹ – sem convergência; na² –ajuste ruim à equação de Boltzmann.

Por meio da TABELA 4.7, pode-se observar que no pH 7,0 a concentração de IPQ teve influência mais acentuada do que no pH 3,5, sendo que as amostras com 15% de IPQ resultaram em valores de G' maiores após a etapa de aquecimento e resfriamento. Segundo Hegg (1982), a geleificação ocorre principalmente na fronteira entre agregação e solubilidade. Durante a desnaturação por aquecimento, altas concentrações são mais propensas para a formação de precipitados e baixas concentrações a formação de géis.

Durante o resfriamento G' e G'' diminuíram, comportamento atribuído ao rearranjo das cadeias polipeptídicas e maior afinidade proteína-proteína, formando precipitados proteicos que ocorrem de maneira desordenada.

As temperaturas de geleificação das amostras preparadas em pH 7,0 foram menores do que as preparadas em pH 3,5. Por exemplo, em pH 3,5, a amostra 5 (15% de IPQ, Ca²⁺) apresentou temperatura de geleificação de 65,3°C e, em pH 7,0, a amostra 11 com mesma condição de solvente teve temperatura de geleificação de 86,4°C. Segundo Chodankar *et al.* (2009), a temperatura de geleificação de uma proteína aumenta na medida que o pH aumenta devido a maior força de repulsão eletrostática entre as moléculas, o que dificulta a sua agregação.

No presente trabalho a partir de análise visual, durante o preparo, as amostras preparadas em pH 7,0 foram menos homogêneas do que as preparadas em pH 3,5, ocorrendo a formação de precipitados. Após as análises reológicas (aquecimento e resfriamento), as amostras de pH 7,0 apresentaram coloração amarelada e aparência de gel quebradiço, e, em alguns casos perda de água, como pode ser observado no APÊNDICE 3 (pág 106). Quando na ausência de sais, ao final da análise, obteve-se uma solução com presença de proteína precipitada ou coagulada confirmando os resultados obtidos por meio da reologia. Renkema *et al.* (2000) observaram para amostras de proteína de soja que em pH 7,6 redes com cadeias mais finas são formadas, caracterizadas por baixos valores de G' e aparência suave e ligeiramente turva conforme observou-se nesse estudo.

4.3.4 Relação entre a geleificação e a desnaturação proteica

Comparando a temperatura de geleificação das amostras (TABELA 4.6 e 4.7 – pág. 78 e 83) com a temperatura de desnaturação (TABELA 4.5 – pág. 72) nas mesmas condições, observa-se que para o pH 3,5 todas as amostras apresentaram temperatura de geleificação menor do que a temperatura de desnaturação. Resultados similares foram obtidos por Bejarano-Luján, Cunha e Netto (2010) em isolados proteicos de amaranto onde não foi necessária a desnaturação completa para a formação de géis proteicos. Segundo Totosa *et al.* (2002), isso ocorre devido a diminuição no pH causar desnaturação suficiente para proporcionar interações entre as cadeias de proteínas e a formação de uma estrutura de rede.

Nas amostras em pH 7,0 a temperatura de geleificação foi maior que a temperatura de desnaturação em todas as condições estudadas, ou seja, foi necessário que a proteína estivesse completamente desnaturada para a formação da rede de gel. Neste pH a desnaturação térmica é a responsável pelo desnovelamento da proteína e exposição dos grupos reativos.

A FIGURA 4.13 apresenta os resultados dos estágios de desnaturação proteica obtidos por meio do DSC para o último pico observado ao longo do aquecimento nas diferentes condições estudadas.

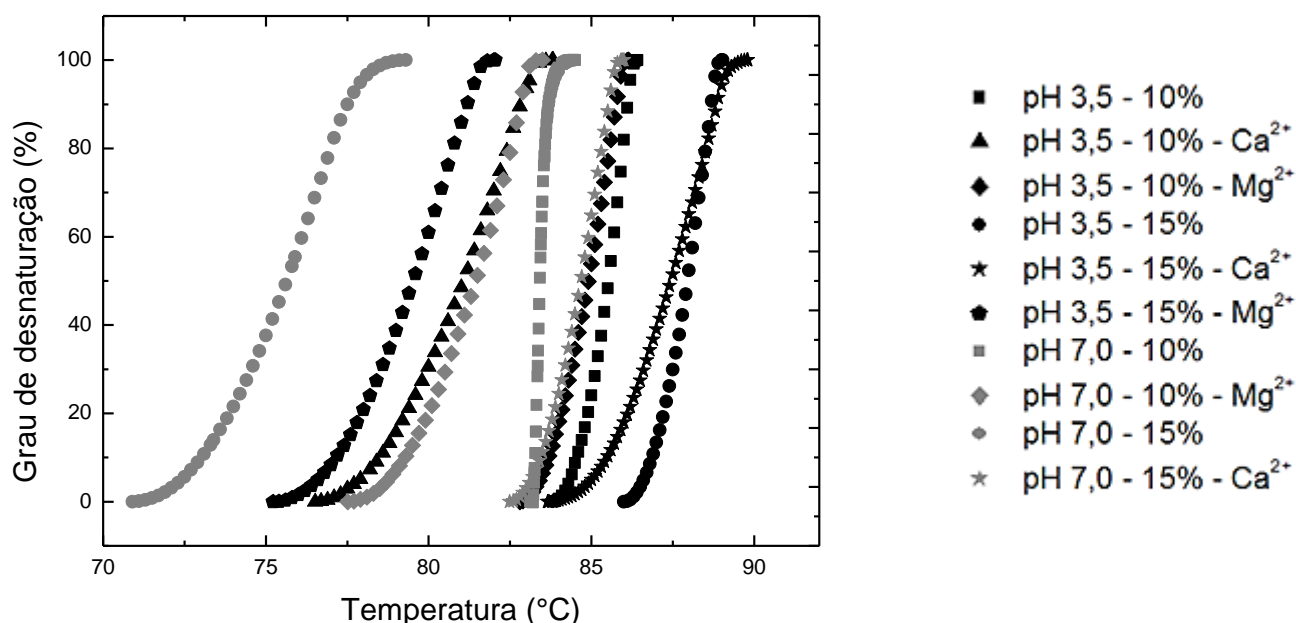


FIGURA 4.13 – GRAU DE DESNATURAÇÃO PROTEICA PARA AS DIFERENTES SOLUÇÕES PROTEICAS ANALISADAS POR DSC.

Renkema e Van Vliet (2002) observaram que em proteínas de soja a desnaturação e agregação ocorrem de maneira cooperativa, sendo que a temperatura de geleificação se encontra em algum estágio de desnaturação. Este comportamento foi atribuído ao equilíbrio existente em cada temperatura entre as proteínas no estado nativo e as proteínas no estado desnaturado. Esse desdobramento parcial das proteínas, favorece a exposição de grupos funcionais tais como grupos sulfidril ou grupos hidrofóbicos que interagem entre si favorecendo a formação da rede de gel. Porém neste estudo, a geleificação não foi observada entre algum estágio de desnaturação, ocorrendo antes ou após a desnaturação completa da proteína mostrando que o processo de geleificação ocorre separadamente ao processo de desnaturação para as proteínas de quinoa.

5 CONCLUSÃO

A melhor condição de obtenção do isolado proteico de quinoa foi utilizando farinha não deslipidificada de quinoa com solubilização das proteínas em pH 8,0 com 0,5 M de NaCl. Essas condições proporcionaram o isolamento principalmente da globulina 11S, conforme confirmado por técnica de MALDI-ToF/MS, com menor contaminação por amido verificado pelo teste do lugol. O isolado proteico de quinoa obtido neste estudo apresentou composição de proteínas de 88,5% e teor de umidade de 3,4%.

A análise de DSC nas amostras de IPQ nas diferentes condições estudadas mostraram principalmente um pico endotérmico. A temperatura de desnaturação das amostras de IPQ indica uma alta estabilidade característica de globulinas, com temperaturas de desnaturação próximas a 80°C. A desnaturação ocorreu em temperaturas mais altas para o pH 3,5 quando comparado ao pH 7 em todas as amostras devido a maior atração proteína-proteína em condições de pH ácido.

Em relação à geleificação, o IPQ mostrou capacidade de formação de géis proteicos tanto no pH 3,5 quanto no pH 7,0 porém no pH 7,0 o gel formado não foi estável ao resfriamento. Os valores de G' e G'' obtidos por meio de reologia oscilatória aumentaram durante rampa de aquecimento para todas as amostras estudadas. E na etapa de resfriamento G' e G'' diminuíram para as amostras em pH 7,0 mostrando que neste pH a geleificação não é estável ao resfriamento, formando agregados com expulsão de água. No pH 3,5 os módulos viscoso e elástico aumentaram ou mantiveram-se constantes para as amostras em pH 3,5. A concentração de IPQ no pH 7,0 teve influência mais acentuada do que no pH 3,5, sendo que as amostras com 15% de isolado resultaram em valores de G' maiores durante o aquecimento.

Os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} influenciaram o processo de geleificação. No pH 3,5 géis a frio foram formados na presença desses íons apresentando elevada viscoelasticidade nas análises reológicas logo no início dos experimentos. No pH 7, quando esses íons foram adicionados nas soluções proteicas a geleificação foi dificultada e precipitados foram obtidos.

A desnaturação completa não foi essencial para a formação dos géis proteicos em pH 3,5 conforme foi constatado pelo DSC e reologia. No pH 7,0 foi necessária a desnaturação completa das proteínas para que ocorresse a geleificação.

Os resultados obtidos indicam que as proteínas de quinoa possuem capacidade geleificante formando géis com características similares a proteínas do soro do leite e da soja. As proteínas de quinoa mostraram potencial de aplicação em alimentos como substituta de proteínas geleificantes ou no desenvolvimento de novos produtos, tanto para o aumento da viscoelasticidade de alimentos ou como meio de incorporação de sais minerais como o cloreto de cálcio e o cloreto de magnésio.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, observa-se que existe a necessidade de estudos complementares para o entendimento e a otimização da geleificação das proteínas de quinoa. As sugestões para trabalhos futuros são:

- Estudo da rede de gel por microscopia confocal de varredura a laser ou microscopia de varredura a fim de determinar a densidade das cadeias do gel e a sua dimensão fractal;
- Avaliar a interação dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} com as proteínas de quinoa por meio de calorimetria de titulação isotérmica;
- Estudo da geleificação a frio utilizando diferentes concentrações de Ca^{2+} em pH ácido por meio de análise de textura e reologia;
- Estudo da formação dos géis proteicos com adição de outros componentes utilizados em alimentos;
- Avaliação da estabilidade dos isolados proteicos durante o armazenamento.

REFERÊNCIAS

ABUGOCH, L. E.; ROMERO, N.; TAPIA, C.; SILVA, J.; RIVERA, M. study of some physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4745–4750, 2008.

AHMED, J., RAMASWAMY, H.S., ALLI, I., NGADI, M. Effect of high pressure on rheological characteristics of liquid egg. *LWT- Food Science and Technology*, v. 36, n. 5, p. 517–524, 2003.

ALMEIDA, I. F. M. Desenvolvimento e caracterização de oleogeles. Dissertação (mestrado em Tecnologia Farmacêutica). Universidade do Porto, Porto, 2002.

ALUKO, R. E.; MONU, E. Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 4, p. 1254-1258, 2003.

ALTING, A. C.; JONGH, H. H. J.; VISSCHERS, R. W.; SIMONS, J. F. A. Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4682–4689, 2002.

ALVES, L. F.; ROCHA, M. S.; GOMES, C. C. F. Avaliação da qualidade protéica da Quinoa Real (*Chenopodium quinoa* Willd) através de métodos biológicos. **E-scientia**, v.1, n.1, 2008.

ANDO, H.; CHEN, Y.; TANG, H.; SHIMIZU, M.; WATANABE, K.; MITSUNAGA, T. Food components in fractions of quinoa seed. **Food Science and Technology Research**, v. 8, n. 1, p. 80–84, 2002.

ANDRADE, C. T.; NASSER, R. O. Estudo reológico da gelificação induzida pelo calor de proteínas do soro do leite e dos géis resultantes sob condições variadas de pH. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n. 2, p. 315-321, 2005.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. (18th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 2005.

AVANZA, M. V.; PUPPO, M. C.; AÑÓN, M. C. Rheological characterization of amaranth protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 889–898, 2005.

BALNY, C.; MASSON, P. Effects of high pressure on proteins. **Food Review International**, v. 9, p. 611–628, 1993.

BARRIO, D. A; AÑÓN, M. C. Potential antitumor properties of a protein isolate obtained from the seeds of *Amaranthus mantegazzianus*. **European Journal of Nutrition**, v. 49, p. 73–82, 2010.

BEJARANO-LUJÁN, D. L.; CUNHA, R. L.; NETTO, F. M. Structural and rheological properties of amaranth protein concentrate gels obtained by different processes. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 602-610, 2010.

BICUDO, M. O. P; VASQUES, E. C.; ZUIM, D. R.; CANDIDO, L. M. B. Elaboração e caracterização de bebida fermentada à base de extrato hidrossolúvel de quinoa com polpa de frutas. **Boletim CEPPA**, v. 30, n. 1, p. 19-26, 2012.

BORDERÍAS, A. J.; MONTERO, P. Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas en alimentos. **Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v. 28, n. 2, p. 159-169, jun./ago. 1988.

BORGES, J. T.; BONOMO, R. C.; PAULA, C. D.; OLIVEIRA, L. C.; CESÁRIO, M. C. Características físico-químicas, nutricionais e formas de consumo da quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). **Temas agrários**, Córdoba, v. 15, n. 1, p. 9 – 23, 2010.

BORGES, J. T. S.; ASCHERI, J. L. R.; ASCHERI, D. R.; NASCIMENTO, R. E.; FREITAS, A. S. Propriedades de cozimento e caracterização físico química de macarrão pré-Cozido à base de farinha integral de quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) e de farinha de arroz (*Oryza sativa*, L) polido por extrusão termoplástica. **Boletim CEPPA**, v. 21, n. 2, p. 303-322, 2003.

BOSCAIU, M.; VICENTE, O. Halophytic crops for a salinising world. **Bulletin UASVM Horticulture**, v. 70, n. 1, p 1-9, 2013.

BRADFORD, M.M.A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADY, K.; HO, C.; ROSEN, R. T.; SANG, S.; KARWE, M. V. Effects of processing on the nutraceutical profile of quinoa. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1209-1216, 2007.

BRINEGAR, C.; GOUNDAN, S. Isolation and characterization of chenopodin, the 11S seed storage protein of quinoa (*Chenopodium quinoa*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 182-185, 1993.

BRINEGAR, C.; GOUNDAN, S. High-cysteine 2S seed storage proteins from quinoa (*Chenopodium quinoa*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 7, 1996.

BRYANT, C. M.; MCCLEMENTS, D. J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat denatured whey. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 143-151, 1998.

CALDERELLI, V. A. S.; BENASSI, M. T.; VISENTAINER, J. V.; MATIOLI, G. Quinoa and flaxseed: potential ingredients in the production of bread with functional quality. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n.4, p. 981-986, 2010.

CASTRO, A. G. **A Química e a Reologia no Processamento dos Alimentos**. Lisboa: Instituto Piaget, 2003.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

CHAUHAN, G. S.; CUI, W.; ESKIN, N. A. M. Effect of saponin on the surface properties of quinoa proteins. **International Journal of Food Properties**, v. 2, p. 13-22, 1999.

CHODANKAR, S.; ASWAL, V. K.; KOHLBRECHER, J.; VAVRIN, R.; WAGH, A. G. Small-angle neutron scattering study of structure and kinetics of temperature-induced protein gelation. **Physical Review**, v. 79, p. 1-7, 2009.

DAMODARAN, S.; KINSELLA, J. E. **Food protein deterioration mechanisms and functionality**, New York: American Chemical Society, 1982.

DAMODARAN, S.; PARAF, A. **Food Proteins and Their Applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. 1-681p.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DEGÁSPARI, C. H.; SILVA, N. M. Desenvolvimento de aplicações tecnológicas na forma pré-gelatinizada para grãos de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). **Visão Acadêmica**, v.11, n.1, 2010.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DRZEWIECKI, J.; DELGADO-LICON, E.; HARUENKIT, R.; PAWELZIK, E.; MARTIN-BELLOSO, O.; PARK, Y.; JUNG, S.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. Identification and differences of total proteins and their soluble fractions in some pseudocereals based on electrophoretic patterns. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 7798–7804, 2003.

ELGETI, D.; NORDLOHNE, S. D.; FÖSTE, M.; BESL, M.; LINDEN, M. H.; HEINZ, V.; JEKLE, M.; BECKER, T. Volume and texture improvement of gluten-free bread using quinoa white flour. **Journal of Cereal Science**, v. 59, p. 41-47, 2014.

FAO. Quinoa: **An Ancient Crop to Contribute to World Food Security**. 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/017/aq287e/aq287e.pdf>>. Acesso em: 20/01/2014.

FAO. **Master Plan for the International Year of Quinoa: A Future Sown Thousands of Years Ago**. 2013 a. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/aiq2013/res/en/master_plan.pdf>. Acesso em: 20/01/2014.

FAO. **Food Outlook: Bianual Report on Global Food Market**. 2013 b. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/al999e/al999e.pdf>>. Acesso em: 20/01/2014.

FARFÁN, J. A. **Química de proteínas aplicada à ciência e tecnologia de alimentos**. Campinas: Editora UNICAMP, 1990

FITZSIMONS, S. M.; MULVIHILL, D. M.; MORRIS, E. R. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 638 – 644, 2007.

FOEGEDING, E. A. Food biophysics of protein gels: a challenge of nano and macroscopic proportions. **Food Biophysics**, v. 1. p. 41-50, 2006.

GOLTZ, C. **Avaliação da interação da β -lactoglobulina-pectina e carboximetilcelulose separadamente por calorimetria de titulação isotérmica**. 81f. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

GOSAL, W. S.; ROSS-MURPHY, S. B. Globular protein gelation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 5, p. 188-194, 2000.

HEGG, P. Conditions for the formation of heat-induced gels of some globular food proteins. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 1241–1244, 1982.

HERMANSSON, A. M. Soy protein gelation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 63, n. 5, p. 658-666, 1986.

HUA, Y.; CUI, S. W.; WANG, Q.; MINE, Y.; POYSA, Y. Heat induced gelling properties of soy protein isolates prepared from different defatted soybean flours. **Food Research International**, v. 38, p. 377–385, 2005.

HUDSON, B. J. F. **Biochemistry of food protein**. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1996.

IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

KEBELMANN, K.; HORNUNG, A.; KARSTEN, U.; GRIFFITHS, G. Intermediate pyrolysis and product identification by TG and Py-GC/MS of green microalgae and their extracted protein and lipid components. **Biomass and Bioenergy**, v. 49, p. 38-48, 2013.

KINSELLA, J. E. Functional properties of soy proteins. **J. Am. Oil Chem. SOC.** p. 56-242, 1979.

KOZIOL, M. Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 5, n. 1, p. 35-68, 1992.

KUHN, K. R.; CAVALLIERI, A. L. F.; CUNHA, R. L. Cold-set whey protein gels induced by calcium or sodium salt addition. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 348–357, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembling of the head of the bacteriophage T7. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAKEMON, C. M. M.; JONGH, H. H. J.; PAQUES, M.; VAN VLIET, T.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A. G. J. Gelation of soy glycinin; influence of pH and ionic strength on network structure in relation to protein conformation. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 365–377, 2003.

LINDEBOOM, N. 152 f. **Studies on the characterization, biosynthesis and isolation of starch and protein from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)**. Thesis (Doctor of Philosophy in the Department of Applied Microbiology and Food Science), University of Saskatchewan, Saskatoon, 2005.

LU, X.; LU, Z.; YIN, L.; CHENG, Y.; LI, L. Effect of preheating temperature and calcium ions on the properties of cold-set soybean protein gel. **Food Research International**, n. 43, p. 1673–1683, 2010.

LUVIELMO, M. M.; ANTUNES, A. J. Influência da adição de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} na dureza de géis de concentrado proteico de soro de leite bovino. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 22, n. 2, p. 205-209, 2002.

MANZO, J. A. S. **Obtencion, caracterizacion y relacion estructura – funcionalidad de un aislado proteico de quinua (*chenopodium quinoa*) organica proveniente de la vi region de chile**. 61f. Estudios de postgrado (Ingeniero en Alimentos) Universidad de Chile, Santiago, 2006.

MIRANDA, M.; A. VEGA-GÁLVEZ; MARTINEZ, E.; LÓPEZ, J.; RODRÍGUEZ, M. J.; HENRÍQUEZ, K.; FUENTES, F. Genetic diversity and comparison of physicochemical and nutritional characteristics of six quinoa (*Chenopodium quinoa willd.*) genotypes cultivated in Chile. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 4, p. 835-843, 2012.

MISUGI, C. T. **Efeitos do congelamento e de crioprotetores na interação entre proteína modelo GlnK e ATP por calorimetria de titulação isotérmica**. 80f. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análises Térmicas de Materiais**. São Paulo: Artliber, 2009.

MUJICA, A.; JACOBSEN, S. La quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*) y sus parientes silvestres. In: Moraes, M.; Ollgaard, R., B.; Kvist, L. P.; Borchsenius, F.; Balslev, H. **Botánica Económica de los Andes Centrales**, La Paz: Balslev Universidad Mayor de San Andrés, 2006.

NAGANO, T.; TOKITA, M. Viscoelastic properties and microstructures of 11S globulin and soybean protein isolate gels: Magnesium chloride-induced gels. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1647e1654, 2011.

NCBI. **Protein**. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=quinoa+globulin>. Acesso em: 02/10/2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Biquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 75-156.

OGUNGBENLE, H. N.; OSHODI, A. A.; OLADIMEJI, M. O. The proximate and effect of salt applications on some functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, n.1, p. 49-32, 2009.

PAGAMUNICI, L. M.; GOHARA, A. K.; SOUZA, A. H. P.; BITTENCOURT, P. R. S.; TORQUATO, A. S.; BATISTON, W. P.; GOMES, S. T. M.; SOUZA, N. E.; Visentainer, J. V.; Matsushita, M. Using chemometric techniques to characterize gluten-free cookies containing the whole flour of a new quinoa cultivar. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 00, n. 00, p. 1-10, 2013.

PALOMBINI, S. V.; CLAUS, T.; MARUYAMA, S. A.; GOHARA, A. K.; SOUZA, A. H. P.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V.; GOMES, S. T.; MATSUSHITA, M. Evaluation of nutritional compounds in new amaranth and quinoa cultivars. **Food Sci. Technol**, v. 33, n. 2, p. 339-344, 2013.

PHAN-XUAN, T.; DURAND, D.; NICOLAI, T.; DONATO, L.; SCHMITT, C.; BOVETTO, L. Heat induced formation of beta-lactoglobulin microgels driven by addition of calcium ions. **Food Hydrocolloids**, v. 34, p. 227-235, 2014.

PHILLIPS, L. G.; WHITEHEAD, D. M.; KINSELLA, J. **Structure-Function Properties of Food Proteins**. p. 179–204. San Diego: Academic Press, 1994.

POPOVIĆ, L. M.; PERIČIN, D. M.; VAŠTAG, Z. G.; POPOVIĆ, S. G. Optimization of transglutaminase cross-linking of pumpkin oil cake globulin; improvement of the solubility and gelation properties. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 1105–1111, 2013.

PREGO, I., MALDONADO, S. E OTEGUI, M. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. **Annals of Botany**, Rennes Drive, v. 82, n. 4, p. 481-488, 1998.

RAMOS, O. L., PEREIRA, J. O., SILVA, S. I., AMORIM, M. M., FERNANDES, J. C., LOPES-DA-SILVA, J. A., PINTADO, M. E., & MALCATA, X. Effect of composition of commercial whey protein preparations upon gelation at various pH values. **Food Research International**, 48, 681–689, 2012.

RENKEMA, J. M. S. Relations between rheological properties and network structure of soy protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 39–47, 2004.

RENKEMA, J. M. S.; GRUPPEN, H.; VAN VLIET, T. Influence of pH and Ionic Strength on heat-induced formation and rheological properties of soy protein gels in relation to denaturation and their protein compositions. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 6064-6071, 2002.

RENKEMA, J. M. S.; VAN VLIET, T. Heat-Induced gel formation by soy proteins at neutral pH. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 1569–1573, 2002.

RENKEMA, J. M. S.; LAKEMON, K. M. M.; JONGH, H. H. J.; GRUPPEN, H.; VAN VLIET, T. The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins. **Journal of Biotechnology**, v. 79, p. 223–230, 2000.

REPO-CARRASCO-VALENCIA, R.; HELLSTROM, J.K.; PIHLAVA, J.M.; MATTILA, P.H. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kaniwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). **Food Chemistry**, v. 120, p. 128–133, 2010.

RUALES, J.; NAIR, B. M. N. Saponins, phytic acid, tannins and protease inhibitors in quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds. **Food Chemistry**, v. 48, p. 137-143, 1993.

SANCHEZ, A. C.; BURGOS, J. Factors affecting the gelation properties of hydrolyzed sunflower proteins. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 2, p. 284–288, 1997.

SAVI, L. K. **Caracterização térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) das frações ricas em glutenina do trigo (*Triticum aestivum*, cultivar BRS-Parrudo) obtidas por diferentes métodos de extração**. 68f. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 368-379, 1987.

SCHARAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos**. Ed. 2. São Paulo: Artliber, 2006.

SIENER, R.; HÖNOW, R.; SEIDLER, A.; VOSS, S.; HESSE, A. Oxalate contents of species of the *Polygonaceae*, *Amaranthaceae* and *Chenopodiaceae* families. **Food Chemistry**, v. 98, p. 220–224, 2006.

SINGH, T. K.; ØISETH, S. K.; LUNDIN, L.; DAY, L. Influence of heat and shear induced protein aggregation on the in vitro digestion rate of whey proteins. **Food & Function**, v. 11, n. 5, p. 2686-98, 2014.

SILVA, L. M. R.; ABREU, D. A.; SOARES, D. J.; PONTES, D. F.; CONSTANT, P. B. L. Processamento de bolo com farinha de quinoa (*Chenopodium Quinoa*

Willd): estudo de aceitabilidade. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, n.2, p.125-132, 2010.

SILVEIRA, G. L. P. **Identificação de proteínas com expressão induzida por choque térmico em *Herbaspirillum seropedicae***. 63f. Dissertação (Pós-graduação em Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Bol. SBCTA**, v. 32, n. 1, p. 105-126, 1998.

SOBRAL, P. A., PALAZOLO, G. G., WAGNER, J. R. Effect of water content on thermal behavior of freeze-dried soy whey and their isolated proteins. **J. Agric. Food Chem**, v. 59, p. 3950–3956, 2011.

SPEHAR, C. R.; CABEZAS, W. A. R. L. Introdução e seleção de espécies para a diversificação do sistema produtivo nos cerrados. In: CABEZAS, W. A. R. L.; FREITAS, P. L. (Ed.) **Plantio direto na integração lavoura pecuária**. Uberlândia: UFU, 2000.

SPEHAR, C. R.; ROCHA, J. E. S.; SANTOS, R. L. B. Desempenho agrônômico e recomendações para cultivo de quinoa (BRS Syetetuba) no cerrado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 1, p. 145-147, 2011.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods In Food Process Engineering**. 2. Ed. East Lansing: Freeman Press, 1996.

TARONE, A. G.; FASOLIN, L. H.; PERRECHIL, F. A.; HUBINGER, M. D.; CUNHA, R. L. Influence of drying conditions on the gelling properties of the 7S and 11S soy protein fractions. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 111–120, 2013.

TAVERNA, L. G.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Changes in physical properties of extruded sour cassava starch and quinoa flour blend snacks. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 4, p. 826-834, 2012.

THIEDE, B.; HÖHENWARTER, W.; KRAH, A.; MATTOW, J.; SCHMID, M.; SCHMIDT, F.; JUNGBLUT, P. R. Peptide mass fingerprinting. **Methods**, v. 35, p. 237-247, 2005.

TORREZ, M. O.; GUZMAN, A. A.; CARVAJAL, R. Valoración nutricional de 10 variedades de Quinoa (Chenopodin quinoa Willd) del altiplano boliviano. **Biofarbo**, v. 10, p. 55-60, 2002.

TOTOSAUS, A.; MONTEJANO, J. G.; SALAZAR, J. A.; GUERRERO, I. A review of physical and chemical protein-gel induction. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 589–601, 2002.

YADA, R. Y. **Proteins in food processing**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004.

YADA, R. Y.; JACKMAN, R.L.; SMITH, J.L. **Protein Structure-Function Relationships in Foods**. New York: Springer Science e Business Media, 1994.

URBONAITE, V.; JONGH, H. H. J.; VAN DER LINDEN, E.; POUVREAU, L. Origin of Water Loss from Soy Protein Gels. *J. Agric. Food Chem*, v. 62, p.7550 –7558, 2014.

VALENZUELA, C.; ABUGOCH, L.; TAPI, C. Quinoa protein-chitosann-sunflower oil edible film: Mechanical, barrier and structural properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 531e537, 2013.

VILCHE, C.; GELY, M.; SANTALLA, E. Physical properties of quinoa seeds. **Biosystems Engineering**, v. 86, n. 1, p. 59–65, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – RESULTADOS MALDI-ToF/MS

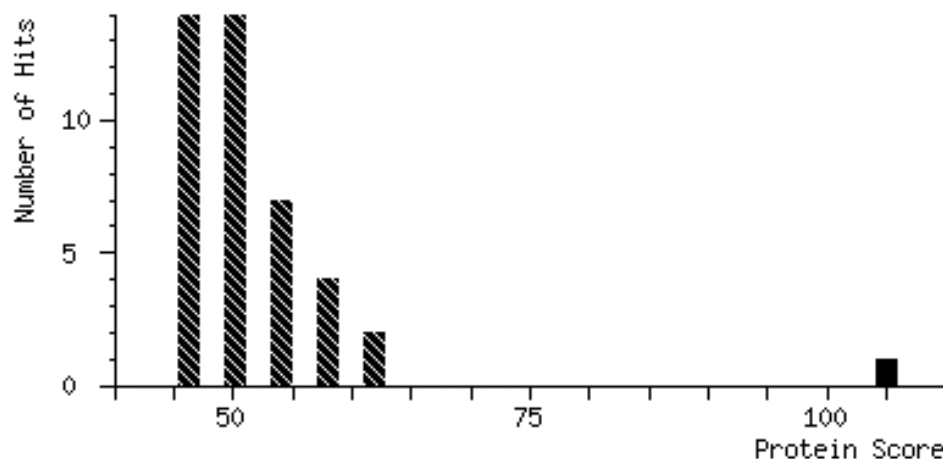


FIGURA A 1.1 - HISTOGRAMA DOS SCORES OBTIDOS POR MEIO DO SOFTWARE MASCOTE

NOTA: corresponde a banda 3 da figura 4.4

TABELA A 1.1 - RESULTADOS DA BUSCA DA *FINGERPRINTING* DA AMOSTRA DE IPQ NO SOFTWARE MASCOT CORRESPONDENTE A BANDA 3 DA FIGURA 4.4

Início	Fim	Observado	Mr (esperado)	Mr calculado)	ppm	M	Peptídeo
1	28	2960,65	2959,65	2959,5	49,5	1	-.MAKSTTTTLFLLSCSIALVLLNGCMGQGR.M + 2 Oxidation (M)
51	77	2994,61	2993,6	2993,42	61,1	0	R.IQAEGLTEVWDTQDQQFQC SGVSVIR.R
138	144	930,501	929,494	929,436	62,9	0	R.FQDQHQK.I
195	207	1560,79	1559,78	1559,78	-2,57	0	R.FYLAGKPQQEHSR.H
212	233	2234,08	2233,08	2233	34,2	1	R.GGESQRGEHGSDGNVFSGLDTK.S
234	248	1566,88	1565,87	1565,76	71,3	0	K.SVAQSFGVSEIDIAEK.L
234	252	2007,04	2006,03	2006,03	0,55	1	K.SVAQSFGVSEIDIAEK LQAK.Q
257	275	2043,22	2042,21	2042,16	22,3	0	R.GNIVLVQEGLHVIKPPSSR.S
276	284	1197,6	1196,6	1196,51	74,9	1	R.SYDDEREQR.H
460	474	1818,93	1817,93	1817,91	7,57	1	R.SETTLFRPENQGRQR.R

Não foram encontrados: 1167.6590, 1353.5711, 1411.8064, 1637.7640, 1722.8409, 1779.8280, 1935.9273, 2081.1520, 2143.4553, 2158.1653, 2205.2941, 2213.1302, 2755.4330, 3065.6837, 3071.6271

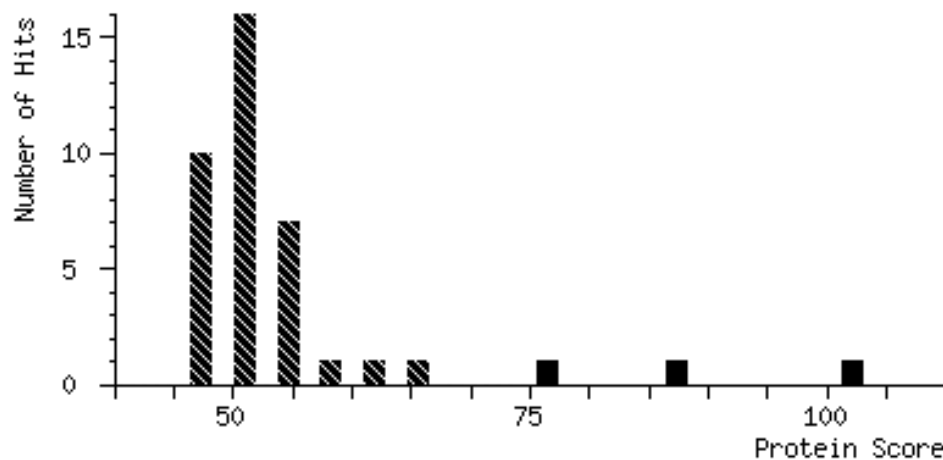


FIGURA A 1.2 - HISTOGRAMA DOS SCORES OBTIDOS POR MEIO DO SOFTWARE MASCOTE

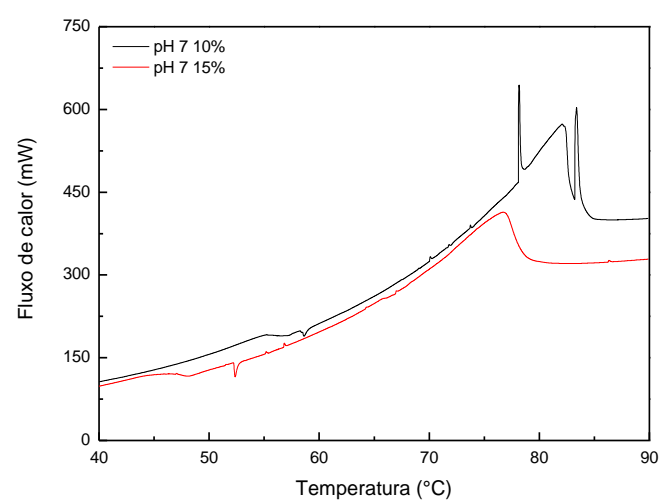
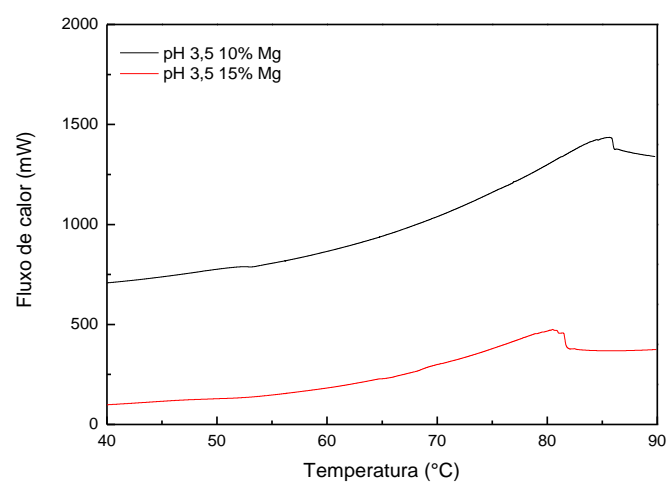
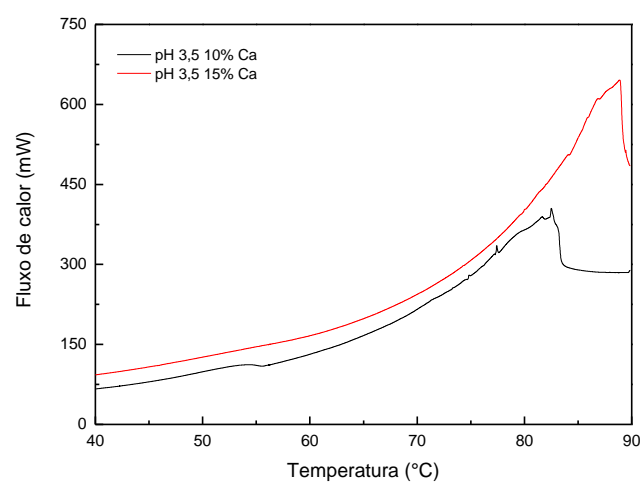
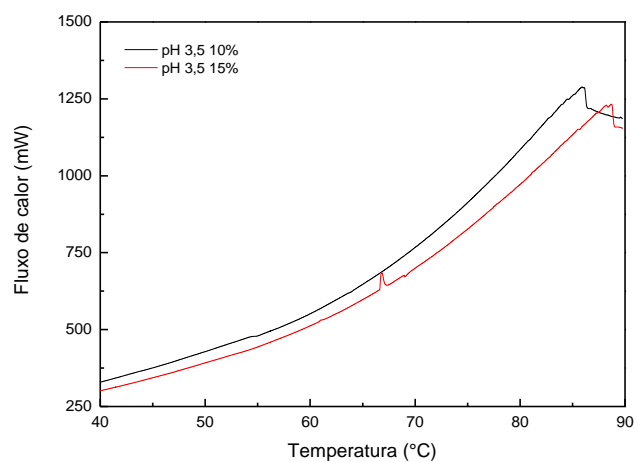
NOTA: corresponde a banda 6 da figura 4.4

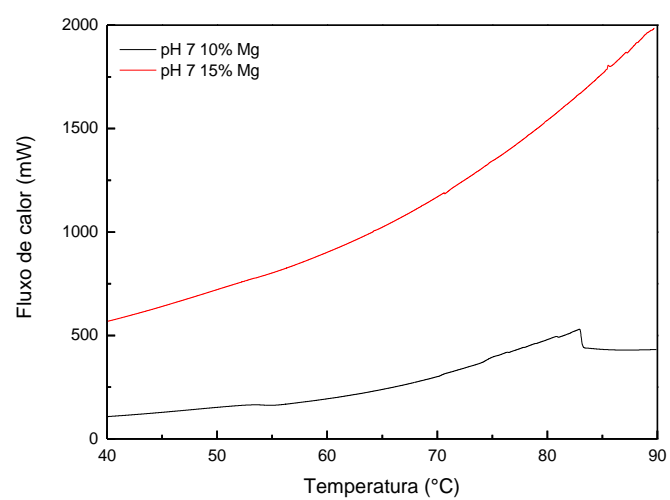
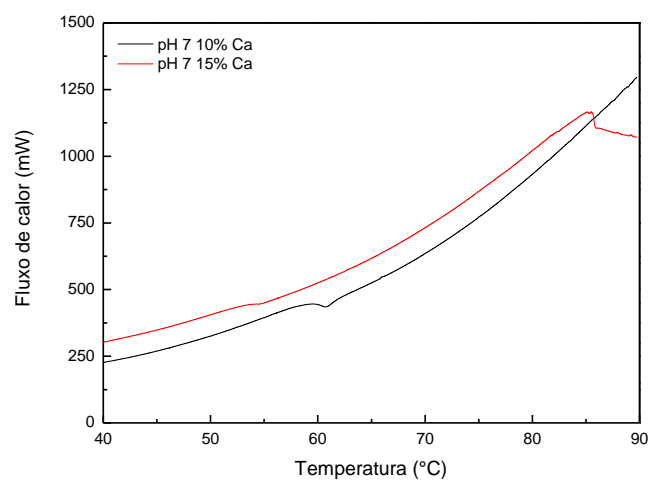
TABELA A 1.- RESULTADOS DA BUSCA DA *FINGERPRINTING* DA AMOSTRA DE IPQ NO SOFTWARE MASCOT CORRESPONDENTE A BANDA 6 DA FIGURA 4.4

Início	Fim	Observado	Mr(esperado)	Mr(calculado)	ppm	M	Peptide
302	321	2163,02	2162,01	2162,01	-0,56	1	R.LSENIDDPKADVYSPEAGR.L
322	337	1816	1814,99	1815,03	-17	0	R.LTTLNSFNLPILSNLR.L
348	367	2254,09	2253,08	2253,15	-30,5	0	R.NAIMAPHYNLNAHSIIYGVR.G R.NAIMAPHYNLNAHSIIYGVR.G +
348	367	2270,14	2269,13	2269,14	-5,72	0	Oxidation (M)
372	388	1917,96	1916,95	1916,96	-3,56	0	R.IQIVNAQGNSVFDDEL.R.Q
389	403	1625,91	1624,9	1624,93	-19	0	R.QGQLVVVPQNFAVVK.Q
404	416	1511,68	1510,68	1510,71	-21,6	0	K.QAGEEGFEWIAFK.T
417	429	1423,68	1422,68	1422,69	-12,3	0	K.TCENALFQTLAGR.T
435	449	1719,87	1718,87	1718,9	-20,5	0	R.AMPVEVISNIYQISR.E R.AMPVEVISNIYQISR.E + Oxidation
435	449	1735,88	1734,87	1734,9	-15,7	0	(M)
460	472	1534,75	1533,74	1533,75	-8,74	0	R.SETTLFRPENQGR.Q

Não foram encontrados: 1389.7119, 1494.6765, 1498.0281, 1516.7015, 1526.7138, 1571.9118, 1608.8684, 1647.8846, 1684.0346, 1733.8802, 1749.8949, 1755.8240, 1873.9554, 1899.9068, 1903.1016, 1932.0130, 2177.0360, 2218.5601, 2257.4859, 2303.1384, 2495.3025, 2642.4612

APÊNDICE 2 – CURVAS DE DSC OBTIDAS PARA AS DIFERENTES SOLUÇÕES DE PROTEÍNA ISOLADA DE QUINOA





APÊNDICE 3 – IMAGENS DAS AMOSTRAS ANALISADAS POR REOLOGIA OSCILATÓRIA

Amostra 1 – 10% de IPQ - pH 3,5

Antes do aquecimento



Depois do aquecimento



Amostra 2 – 10% de IPQ – pH 3,5 – adição de Ca^{2+}

Antes do aquecimento



Depois do aquecimento



Amostra 3 – 10% de IPQ - pH 3,5 – Adição de Mg^{2+}

Antes do aquecimento

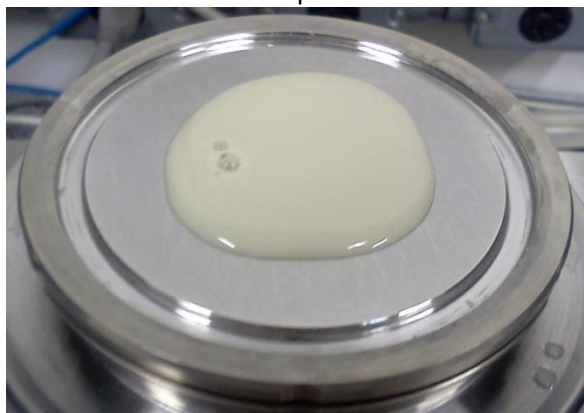


Depois do aquecimento



Amostra 4 – 15% de IPQ – pH 3,5

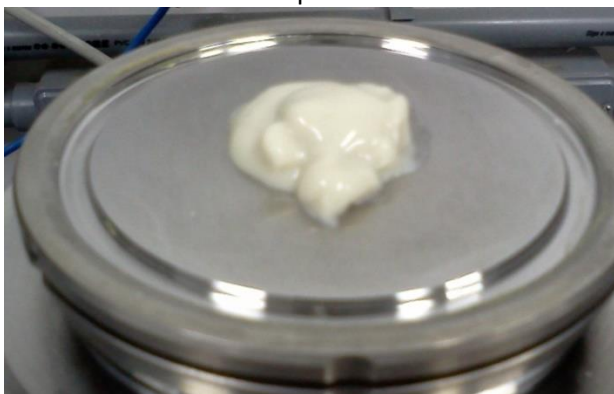
Antes do aquecimento



Depois do aquecimento

**Amostra 5 – 15% de IPQ – pH 3,5 – com adição de Ca^{2+}**

Antes do aquecimento



Depois do aquecimento

**Amostra 6 – 15% de IPQ – pH 3,5 – com adição de Mg^{2+}**

Antes do aquecimento

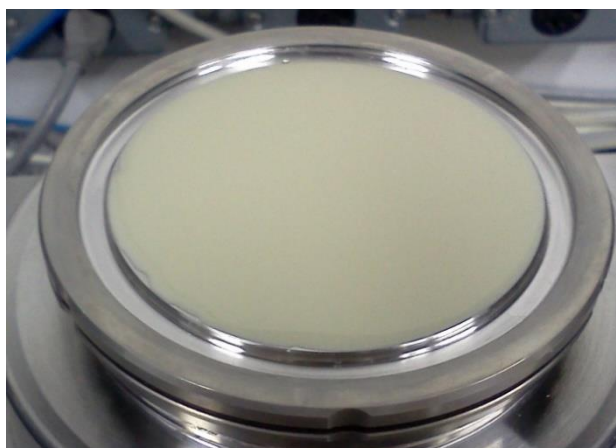


Depois do aquecimento



Amostra 7 – 10% de IPQ – pH 7

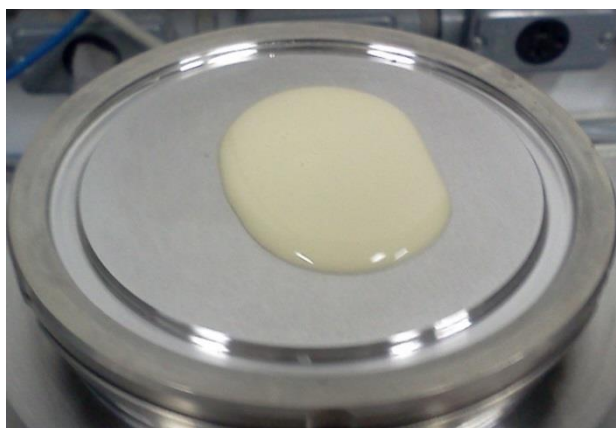
Antes do aquecimento



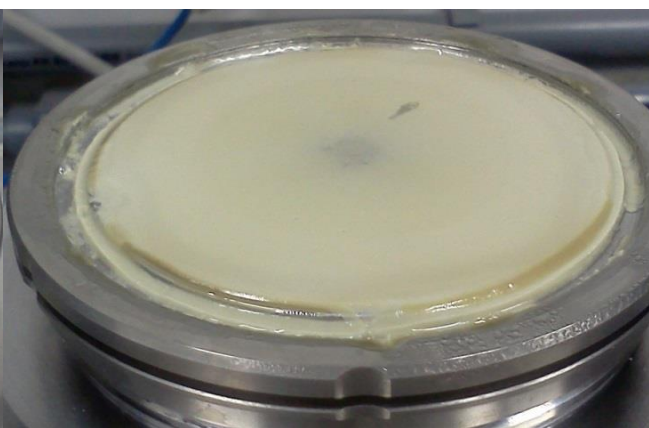
Depois do aquecimento

**Amostra 8 – 10% de IPQ – pH 7 - com adição de Ca^{2+}**

Antes do aquecimento



Depois do aquecimento

**Amostra 9 – 10% de IPQ – pH 7 – com adição de Mg^{2+}**

Antes do aquecimento

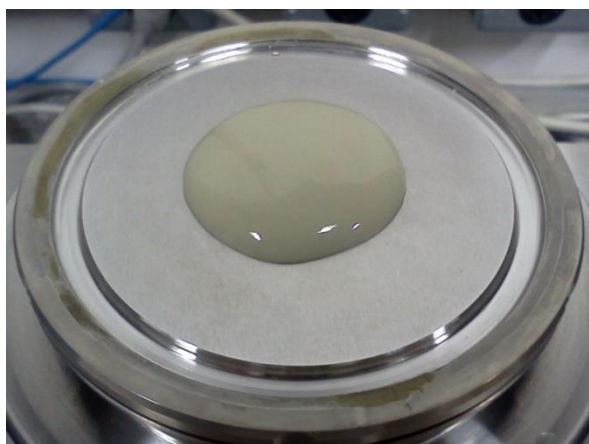


Depois do aquecimento



Amostra 10 – 15% de IPQ – pH 7

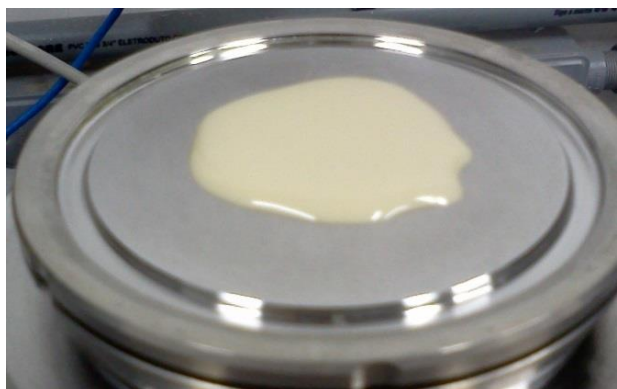
Antes do aquecimento



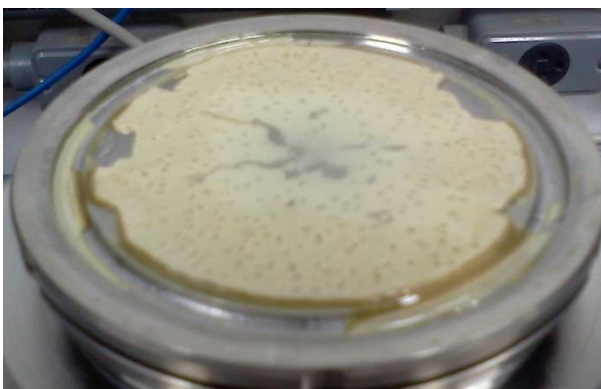
Depois do aquecimento

**Amostra 11 – 15% de IPQ – pH 7 – com adição de Ca^{2+}**

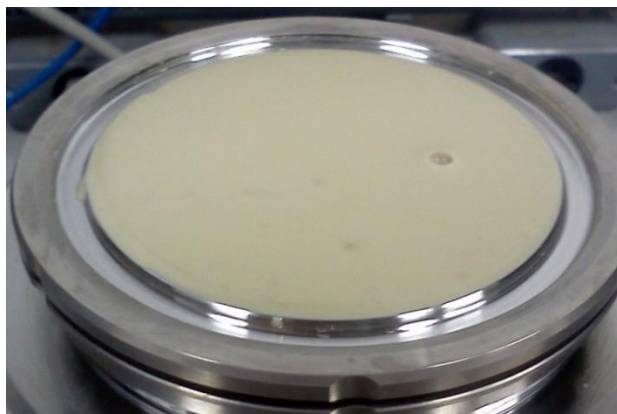
Antes do aquecimento



Depois do aquecimento

**Amostra 12 – 15% de IPQ – pH 7 – com adição de Mg^{2+}**

Antes do aquecimento



Depois do aquecimento



APÊNDICE 4 – AJUSTE SIGMOIDAL DE BOLTZMANN AOS VALORES DE G' OBTIDOS POR REOLOGIA

TABELA A 4.1 - PARAMETROS OBTIDOS POR MEIO DO AJUSTE SIGMOIDAL DE
BOLTZMANN AOS VALORES DE G' PARA AS DIFERENTES AMOSTRAS DE
IPQ

Amostra nº	pH	% IPQ (m/m)	Íon	T _g (°C)	A1 (Pa)	A2 (Pa)	dx	R ²
1	3,5	10	-	82,5	-109,6	21.628,8	4,3	0,9959
2	3,5	10	Ca ²⁺	140,3	264,3	830.819,3	10,9	0,9819
3	3,5	10	Mg ²⁺	64,6	211,8	1.034,4	5,8	0,9897
4	3,5	15	-	75,5	-131,5	19.018,1	5,8	0,9971
5	3,5	15	Ca ²⁺	65,3	627,9	2.017,0	4,8	0,9918
6	3,5	15	Mg ²⁺	77,5	-66,3	11.833,1	9,6	0,9984
7	7,0	10	-	87,4	-11,3	6.880,3	2,3	0,9973
8	7,0	10	Ca ²⁺	55,1	54,5	28,0	1,6	0,2115
9	7,0	10	Mg ²⁺	109,9	0,4	23.530,2	4,1	0,9943
10	7,0	15	-	77,8	-327,8	51.601,3	3,5	0,9972
11	7,0	15	Ca ²⁺	86,4	113,8	24.873,9	1,7	0,9984
12	7,0	15	Mg ²⁺	87,1	41,1	305.431,7	3,8	0,9966